

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : 3915

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

PAR

Jacques BARBIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse : LE pH ET LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION, LA
REPRODUCTION SEXUÉE ET ASEXUÉE D'UNE SAPROLÉGNÉE, INTERACTION
ORGANISME-MILIEU.

Soutenue le 30 janvier 1970 devant la Commission d'examen.

MM. L. PLANTEFOL	<i>Président.</i>
R. WURMSER	} <i>Examineurs.</i>
R. ULRICH	
G. PRÉVOST	<i>Invité.</i>

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1970

N° d'enregistrement
au C.N.R.S. : 3915

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

PAR

Jacques BARBIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse : Le pH ET LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION, LA
REPRODUCTION SEXUÉE ET ASEXUÉE D'UNE SAPROLÉGNÉE, INTERACTION
ORGANISME-MILIEU.

Soutenue le 30 janvier 1970 devant la Commission d'examen.

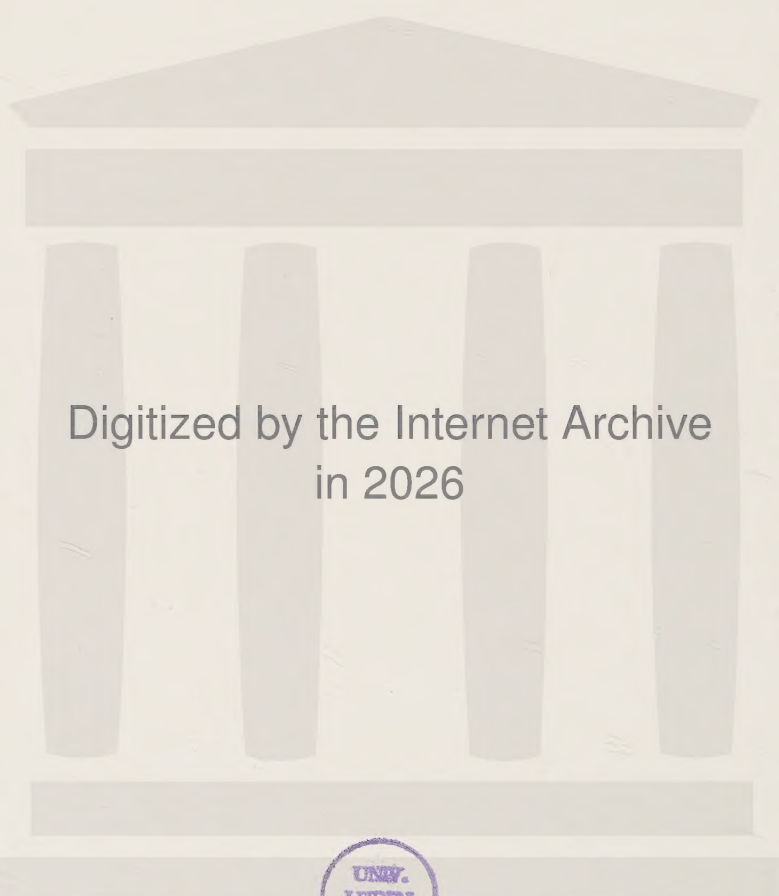
MM. L. PLANTEFOL	<i>Président.</i>
R. WURMSER	} <i>Examineurs.</i>
R. ULRICH	
G. PRÉVOST	<i>Invité.</i>

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026



LE pH ET LE POTENTIEL
D'OXYDO-RÉDUCTION,
LA REPRODUCTION SEXUÉE ET ASEXUÉE
D'UNE SAPROLÉGNÉE,
INTERACTION ORGANISME-MILIEU

Par Jacques BARBIER

Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences de Paris.
Ecole Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, F.75-Paris, 5^e.

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	475
A. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	476
I. — Le choix d'un Champignon	476
II. — Le choix d'un milieu de culture	477
III. — Cultures en milieux confinés et cultures en milieux renouvelés	482
IV. — La mesure de la tension d'oxygène	483
V. — Les solutions tampons et la mesure du pH	485
VI. — La mesure du potentiel d'oxydo-réduction	493
B. — VARIATIONS DU pH ET DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DU MILIEU DE CULTURE SOUS L'INFLUENCE D'UNE SAPROLÉGNÉE	509
I. — Régulation apparente du pH et influence réelle du Champignon sur le pH	509
II. — Influence du Champignon sur la tension en oxygène	511
III. — Influence du Champignon sur le potentiel mesuré	513
C. — INFLUENCE DU pH SUR LE DÉTERMINISME ET LES MODALITÉS DE LA REPRO- DUCTION D'UNE SAPROLÉGNÉE	517
I. — Influence du pH sur la croissance végétative	517
II. — Influence du pH sur la multiplication asexuée	520
ANN. SCI. NATURELLES, BOT., 12 ^e S., T. X, 1969.	31

III. — Influence du pH sur la reproduction sexuée	527
IV. — Influence du pH sur la germination des zygotes et position de la méiose dans le cycle de reproduction	531
V. — Le pH et l'écologie	535
D. — ETUDE DES CONDITIONS LIMITES DE pH ET DE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DÉTERMINANT LA SEXUALITÉ	537
I. — Analyse des résultats en milieu P E Hy P H	537
II. — Analyse des résultats avec d'autres milieux	538
E. — HYPOTHÈSE ET ÉTUDE CRITIQUE D'UNE INFLUENCE DU POTENTIEL DU MILIEU SUR LA CHAÎNE RESPIRATOIRE AU NIVEAU DES CYTOCHROMES	541
I. — Potentiel et pH	541
II. — Potentiel et oxygénation	542
III. — Potentiel et quinones	543
IV. — Potentiel et cytochrome-oxydase	545
V. — Action d'un inhibiteur respiratoire	548
VI. — Considérations sur la chaîne respiratoire	548
VII. — Essai de mise au point et hypothèse	549
VIII. — Le déterminisme de la sexualité	550
F. — CONCLUSIONS	551
<i>Résumé</i>	556
<i>Summary</i>	556
BIBLIOGRAPHIE	558

INTRODUCTION

Les Saprolognées sont des Phycomycètes aquatiques se rencontrant dans les étangs ou dans les rivières. Ils se développent souvent sur des branches tombées dans l'eau. Lorsque les branches se trouvent au contact de la vase, à une certaine profondeur, ces Champignons vivent dans un milieu très mal oxygéné. D'ailleurs ils sont rares dans les milieux où abondent les Algues vertes.

Il y a peu de travaux concernant l'état d'oxydo-réduction des milieux naturels où vivent les Saprolognées, en dehors de ceux de W. HÖHNK et K. J. BOCK (1954) aboutissant à une classification de zones écologiques.

Le lien entre l'activité oxydo-réductrice des Champignons et les colorations vitales a été étudié par A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET (1946).

L'alimentation sulfurée des Saprolognées a été étudiée par M. VOLKONSKY (1932-1934). Ce problème a été repris par de nombreux auteurs et en particulier C. B. DAVEY et G. C. PAPAIVIZAS (1962).

VOLKONSKY (1933) a souligné nettement qu'il existe à ce sujet deux types de Champignons : les uns sont capables de réduire les sulfates, ce sont les euthiotrophes, les autres en sont incapables, ce sont les parathiotrophes. Les Saprolognées présentent ce caractère assez exceptionnel : ce sont des Champignons parathiotrophes, ils ne peuvent utiliser que du soufre réduit.

Il s'agit d'une perte de fonction (A. LWOFF, 1944) qui augmente la dépendance des Saprolognées vis-à-vis de leur milieu naturel. Leur vie se trouve liée à un milieu peu oxydant.

E. C. CANTINO (1955) a souligné que la différence entre les Phycomycètes uniflagellés et les Phycomycètes biflagellés est accusée par le métabolisme. Alors que les uniflagellés peuvent être anaérobies et réaliser des fermentations, les biflagellés ne semblent pas capables de vivre ainsi. Les Saprologniales auraient perdu successivement leur capacité d'assimiler l'ion NO_3^- puis l'ion SO_4^{--} , alors que chez les Leptomitales par exemple, c'est la capacité d'assimiler l'ion NH_4^+ qui est perdue.

Si les problèmes de la nutrition des Saprologniales sont en partie connus, il n'en est pas de même des conditions entraînant la reproduction.

F. K. SPARROW JR. (1960) cite les conclusions de W. C. COKER (1923) reprenant en partie celles de G. KLEBS (1900) et de C. H. KAUFFMAN (1908). Ces conclusions très empiriques sont insuffisantes (T. W. JOHNSON JR., 1956).

A. W. BARKSDALE (1962) précise les proportions de carbone et d'azote qui sont favorables à une bonne sexualité.

DAVEY (C. B.) et G. C. PAPAIVIZAS (1962) étudient l'influence du nombre d'oxydation du soufre introduit dans les milieux nutritifs, sans

préciser le potentiel d'oxydo-réduction qui s'établit dans les cultures.

Devant ces faits, il m'a semblé utile d'étudier les conditions d'oxydo-réduction compatibles avec la reproduction.

Le potentiel Red-Ox étant lié au pH, j'ai été conduit à envisager simultanément ces deux questions. Les auteurs n'ont fait que des remarques limitées sur ce sujet. C'est une lacune que ce travail essaie de combler; elle est d'autant plus regrettable que la classification des Phycomycètes aquatiques repose en grande partie sur les appareils reproducteurs asexués et sexués.

Ce travail a été orienté au départ par des considérations écologiques. La reproduction est sensible à l'influence de nombreux facteurs externes (L. E. HAWKER, 1966). Ici il n'est question que d'envisager trois facteurs : la concentration en ions H^+ , le potentiel d'oxydo-réduction et l'oxygène. Quant aux facteurs internes et aux mécanismes de différenciation et d'inhibition ils sont actuellement très étudiés chez les Uniflagellés (G. TURIAN et M. A. VISWANATHAN, 1966; G. TURIAN, 1969).

Le plan de ce travail a été commandé par les idées suivantes :

- rechercher un milieu de culture approprié;
- utiliser des tampons pH pour essayer de stabiliser ces milieux;
- utiliser des substances capables de stabiliser également le potentiel d'oxydo-réduction, telles que l'hydroquinone;
- étudier les interactions entre le milieu de culture et le Champignon en se limitant au déterminisme et aux modalités de la reproduction;
- essayer de situer ces problèmes vis-à-vis du métabolisme.

A. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

I. — LE CHOIX D'UN CHAMPIGNON

Les Saprologniées ne sont pas rares, mais leur aptitude à se reproduire au laboratoire en culture aseptique n'est pas toujours bonne.

J'ai recueilli une dizaine d'espèces et fait des expériences en culture pure avec l'*Achlya racemosa* Hildebrand, le *Dictyuchus monosporus* Leitgeb et une espèce voisine des Saprologniées, l'*Apodachlya brachynema* (Hildebrand) Pringsheim.

J'ai également utilisé, provenant de Baarn, des souches d'*Achlya bisexualis* Coker et Couch, d'*Achlya flagellata* Coker, de *Protoachlya paradoxa* Coker, de *Saprolegnia Ferax* (Gruith) Thuret.

Mais en définitive ce travail a été réalisé avec une souche d'*Achlya flagellata* Coker qui s'est révélée très résistante, et chaque fois qu'il est question dans ce mémoire d'un Champignon dont le nom n'est pas précisé, il s'agit de cette souche d'*Achlya flagellata*.

C'est un Champignon que j'ai récolté dans les environs de Roscoff, c'est pourquoi je le désigne *Achlya flagellata* souche R. Il présente l'avantage de se reproduire par des sporocystes ayant des aspects variés, généralement de type *achlya*, parfois de type *aplanes*, plus rarement de type *dictyuchus*. En outre sa fertilité est assez grande. La sexualité se réalise avec des anthéridies très développées, mais il y a également des oogones parthénogénétiques et dans certains cas des appareils sexuels très dégénérés (T. W. JOHNSON Jr., 1952).

La sexualité s'est réalisée dans de bonnes conditions pendant 10 ans, ce qui m'a permis de faire de nombreuses expériences.

Plusieurs méthodes d'isolement sont indiquées par T. W. JOHNSON Jr. (1956), mais, en fait, les auteurs utilisent des techniques très variées. Après avoir réalisé une culture exempte de Bactéries par repiquages successifs sur milieux gélosés de SABOURAUD, j'ai cherché à obtenir une culture monosporale.

Des cultures sur bois ont étéensemencées (voir chap. A, II) et placées dans des boîtes de Pétri stériles. A la loupe binoculaire j'ai aspiré, à l'aide d'une micropipette stérilisée, une grappe d'aplanospores (kystes), à l'ouverture d'un sporocyste. Ces aplanospores ont été étalées sur gélose à l'aide d'un tube de verre effilé replié en forme de V. C'est une technique microbiologique banale. J'ai repéré au microscope, sur la gélose, une spore nettement isolée que j'ai prélevée à l'aide d'une aiguille stérilisée. Le prélèvement a été contrôlé au microscope puisensemencé à nouveau sur milieu de SABOURAUD. Le danger est plus de recevoir une spore d'un Champignon étranger que de contaminer le prélèvement par des Bactéries, si tous les instruments sont correctement stérilisés. Une nouvelle série de repiquages successifs sur gélose puis la transplantation en culture sur bois ont montré que la souche ne s'était pas contaminée.

II. — LE CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE

Les Saprologniées sont cultivées de trois manières différentes.

1° Milieux naturels.

Sur des substrats naturels placés dans l'eau distillée, les auteurs emploient des débris végétaux, des graines (graines de chènevis, de pois), des débris animaux (jaune d'œuf), des insectes (termites), etc. (W. V. COKER, 1923; F. K. SPARROW Jr., 1960), j'ai employé des segments de rameaux d'arbres variés (J. BARBIER, 1950). Dans ces conditions le développement des appareils reproducteurs se fait généralement bien, mais la composition du milieu est mal définie. Ces méthodes n'intéressent généralement que les morphologistes et les taxinomistes, mais elles sont très employées.

2° Milieux artificiels.

Les Saprolégniées se développent également sur de nombreux milieux à base de bouillons gélosés. J'ai cultivé l'*Achlya flagellata* souche R sur les milieux plus ou moins dilués de E. C. CANTINO (1949), R. KUHNER (1945), SABOURAUD (voir M. LANGERON et R. VANBREUSEGHEM, 1952). Mais dans ces conditions tous les aspects de la reproduction ne sont pas possibles, en particulier la libération des zoospores. D'autre part, la composition d'un milieu à base de peptones et d'extraits de levure est aussi imprécise que la composition d'un milieu à base de rameaux d'arbres.

3° Milieux synthétiques.

Un troisième type de milieux de culture est fourni par les milieux synthétiques. Ils ont l'intérêt d'offrir des conditions de culture bien définies. Ils sont donc préférables a priori. J'ai cultivé l'*Achlya flagellata* souche R sur les milieux de A. W. BARKSDALE (1960), K. S. BHARGAVA (1946), M. VOLKONSKY (1933). Tous assurent la croissance mais pour faire correctement des mesures de pH et de potentiel Red-Ox ils présentent l'inconvénient d'être gélosés. J'ai donc cherché à réaliser des milieux liquides en utilisant les solutions des milieux synthétiques sans y introduire de gélose.

J'ai dû éviter le milieu de BHARGAVA, car dans les pH acides le dégagement de SH^2 aurait pu détériorer les électrodes des appareils de mesure, en particulier l'électrode d'argent de la sonde polarographique utilisée pour la mesure de l' O^2 .

Le milieu de BARKSDALE étant particulièrement favorable à la reproduction, j'ai fait de nombreux essais pour l'utiliser à l'état liquide, mais des difficultés se sont présentées.

TABLEAU I. — INFLUENCE DES ÉLÉMENTS AJOUTÉS AU MILIEU DE BARKSDALE MODIFIÉ ET LIQUIDE

MILIEU LIQUIDE NON GÉLOSÉ	ÉLÉMENTS AJOUTÉS				
	Gélose	Cystéine	Hydroquinone	Pommier	
+		+	+		Croissance nulle ou très faible.
+					
+					
+	+			+	Croissance et reproduction.
+	+	+			
+	+		+		
+					

Lors du premier repiquage la faible quantité de gélose entraînée permet un faible développement, puis lors du second repiquage les traces de gélose deviennent insuffisantes. Donc le milieu liquide purement synthétique ne peut pas assurer la croissance du Champignon.

J'ai pensé qu'il pouvait y avoir un phénomène de toxicité. J'ai dilué le milieu liquide 2 fois, 5 fois, 10 fois sans résultats valables. Puis j'ai introduit un rameau de Pommier dans le milieu de BARKSDALE liquide non gélosé. Dans ces conditions le Champignon s'est développé normalement et a été fertile (tableau I).

Donc il y a un facteur inconnu nécessaire au développement de ce Champignon. Ce facteur est présent dans le rameau de Pommier et dans la gélose.

Les milieux synthétiques gélosés offrent donc des incertitudes, comme les milieux naturels, car le rôle de la gélose est mal connu.

4° *Le rôle de la gélose.*

En général, les auteurs passent sous silence le rôle nutritif de la gélose, bien que A. L. SCHADE (1940) ait nettement montré que, pour le *Leptomitus lacteus*, la gélose joue un rôle nutritif en fournissant probablement des acides aminés. La gélose peut être remplacée par la L-alanine ou la L-leucine, mais la croissance est plus faible. J'ai cherché à utiliser des milieux de SCHADE non gélosés en les modifiant, en ajoutant de la cystéine, du glucose, des facteurs de croissance, mais lorsque la croissance est possible, la reproduction est nulle ou insignifiante. La transplantation à plusieurs reprises dans de tels milieux ne permet pas de conserver la sexualité.

Le rôle nutritif de la gélose n'est pas exactement connu (P. M. MILLER, 1956), il se manifeste dans des cultures de *Phycomyces* (W. J. ROBINS, 1939) par des substances diffusant librement. Il n'est pas nécessaire qu'il y ait une lyse de la gélose, comme cela se produit avec certaines Bactéries (H. E. GORESLINE, 1933).

5° *Milieu de Barksdale modifié.*

Pour obtenir des milieux tamponnés à différents pH, j'ai modifié le milieu de BARKSDALE (A. W. BARKSDALE, 1960) très légèrement.

J'ai supprimé dans la solution saline B de BARKSDALE, le $\text{KH}_2\text{PO}_4 \frac{\text{M}}{20}$, mais j'ai laissé le $\text{K}_2\text{HPO}_4 \frac{\text{M}}{20}$ pour ne pas affaiblir le milieu en ions K^+ et pour équilibrer dans la mesure du possible l'introduction des ions Na^+ supplémentaires. J'ai introduit les solutions de tampons phosphates de SÖRENSEN contenant du $\text{KH}_2\text{PO}_4 \frac{\text{M}}{15}$. Il n'est pas possible d'éviter les proportions variables des ions dans les tampons. Dans tous les cas le pH obtenu a été déterminé au potentiomètre.

Dans quelques expériences la méthionine a été remplacée par la cystéine. La méthionine est préférable (A. W. BARKSDALE, 1962; C. B. DAVEY et G. C. PAPAVIDAS, 1962).

J'ai ajouté une faible quantité de gélose dans le liquide, moins de 2 g par litre, pour permettre la croissance et la reproduction; la viscosité des solutions n'est pas la même aux différents pH.

Ainsi ce nouveau facteur physique est susceptible d'influencer la formation et la libération des zoospores, rendant les comparaisons difficiles. L'étude présentée au chapitre C, II, ne peut pas être faite en milieu gélosé.

D'autre part, la présence de cystéine ou de méthionine ne favorise pas la mesure du potentiel d'oxydo-réduction. Le potentiel de la cystéine n'est pas réversible (R. WURMSER, 1930) et, en présence d'oxygène, il peut se former des complexes.

C'est dans le but de réaliser un milieu où l'équilibre d'oxydo-réduction s'établit bien (voir chap. A, IV) que j'ai introduit de l'hydroquinone dans quelques séries de milieux de BARKSDALE. Dans ce cas, les 800 ml d'eau distillée du milieu de BARKSDALE ont été remplacés par 800 ml d'une solution d'hydroquinone à $1 \cdot 10^{-6}$ g/l.

Les mesures du pH et du potentiel Red-Ox de ces milieux sont moins stables que celles obtenues avec les cultures sur bois.

Les différents milieux de culture laissent des incertitudes. De plus, ces milieux ne permettent pas de conserver l'activité sexuelle des souches.

Par contre, les lignées constamment cultivées sur bois et dans des milieux P E Hy PH sont restées fertiles pendant 10 ans.

J'ai commis l'imprudence de les négliger pendant un certain temps et de faire uniquement des transplantations sur des milieux de BARKSDALE modifiés. Voyant que les souches devenaient stériles (cela est fréquent en mycologie) je les ai alors repiquées dans des milieux P E Hy PH. Mais elles n'ont pas retrouvé leur fertilité initiale. Heureusement, j'ai eu le temps de multiplier les expériences dans les milieux de type P E Hy PH.

6° Intérêt du milieu naturel stérilisé de type P E Hy PH.

Toutes les expériences en culture sur bois sont réalisées de la façon suivante. Dans chaque erlenmeyer de 250 ml est introduit un segment, coupé au sécateur, de rameau de Pommier ayant un diamètre de 8 à 10 mm et 50 à 60 mm de long. Les lots de rameaux sont constitués de la façon la plus homogène possible, à partir des pousses de l'année d'un Pommier vigoureux. Les rameaux sont toujours prélevés en automne, seules les parties ayant le diamètre désiré sont conservées, il s'agit en général de la base et du milieu des pousses. C'est toujours le même Pommier qui est utilisé. Les bourgeons sont retirés et les rameaux se dessèchent au laboratoire pendant deux mois avant d'être

utilisés. Des rameaux très secs, préparés l'année précédente, se prêtent aussi bien aux cultures.

Dans les milieux désignés par les lettres P E PH, 50 ml d'eau distillée sont versés sur le rameau de Pommier, puis 50 ml de solution tampon SÖRENSEN (voir chap. A, V). Les milieux désignés par les lettres P E Hy PH sont préparés avec un rameau de Pommier, 50 ml d'eau distillée contenant de l'hydroquinone à la concentration de $1 \cdot 10^{-6}$ g/l et 50 ml de solution tampon SÖRENSEN.

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé recouvert par un papier paraffiné maintenu par un anneau de caoutchouc. Notons qu'il faut utiliser des erlenmeyers dont le col est assez large pour permettre l'introduction des électrodes.

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 115° - 120° pendant 25 minutes. L'ensemencement est réalisé au plus tôt un jour après, généralement dans un délai de 8 jours, dans une chambre à rayons ultraviolets assurant des conditions aseptiques. Les mêmes précautions sont employées pour tous les types de cultures qui sont tous placés, après ensemencement, dans une étuve vitrée à 23° . L'ensemencement est réalisé à l'aide d'aiguilles flambées et de pinces fines flambées. Environ 10 mm^3 de mycélium sont prélevés à la périphérie d'une souche étalée dans une boîte de Pétri stérile et transplantés dans leur nouveau milieu.

TABLEAU II. — AGE DES SOUCHES SERVANT A L'ENSEMENCEMENT

	9 mois	11 mois	1 a. 3 m.	1 a. 7 m.	2 a. 3 m.	3 ans	3 a. 3 m.
Pourcentage d'échecs à l'ensemencement.	0 %	0 %	0 %	33 %	66 %	90 %	90 %

Pour chaque série d'expériences, des ensemencements témoins sont réalisés dans des milieux de type P E contenant 100 ml d'eau distillée et un rameau de Pommier pour s'assurer que la souche employée est fertile.

De plus, des séries de témoins sont préparés et conservés rigoureusement dans les mêmes conditions que les cultures. Ces témoins ne diffèrent des cultures que par l'absence d'ensemencement. Leur pH et leur potentiel Red-Ox sont mesurés avec le même soin.

7° *Nomenclature.*

Pour faciliter la désignation des milieux de culture, les lettres employées indiquent la présence d'un matériel donné dans le milieu. Les concentrations sont étudiées au chapitre A, III, et A, IV. Le volume total est toujours de 100 ml. Les nombres situés après P E indiquent

le numéro d'ordre de la série. Les nombres situés après PH indiquent le pH initial de la culture.

- T = milieu témoin non ensemencé.
- P = rameau de Pommier.
- Bark = milieu de Barksdale modifié.
- E = eau distillée.
- Hy = Hydroquinone (p. benzohydroquinone).
- Qu = quinone (p. benzoquinone).
- Cys = cystéine.
- Thio = thio-urée.
- Ré = réductose.
- Mé = bleu de Méthylène.
- PH = tampon pH Sørensen
- PHV = tampon au véronal.
- PHBri = tampon Britton-Robinson.
- Gel = gélose.
- Az = azide = azothydrate de sodium.

III. — CULTURES EN MILIEUX CONFINÉS ET CULTURES EN MILIEUX RENOUVELÉS

Mises à part les cultures sur milieux gélés et sauf mention spéciale, les cultures sont réalisées en milieux liquides confinés.

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé puis recouverts d'un papier paraffiné serré autour du goulot par un élastique. Une couverture supplémentaire à l'aide d'une feuille d'aluminium est utile. L'évaporation est très faible.

Dans ces cultures confinées la composition du milieu change durant toute la vie du Champignon. Les substances nutritives s'appauvrissent, tandis que les substances de déchets s'accumulent.

Pour chercher un remède à cet état de choses, des séries d'expériences en milieux renouvelés ont été réalisées de la façon suivante :

Dans des erlenmeyers de 250 ml à tubulure latérale, de type Pyrex 347, les cultures sont ensemencées dans 100 ml de milieu P E PH. Trois jours après l'ensemencement chaque erlenmeyer est soumis à une perfusion. Dans la culture est introduit un tube de verre effilé relié à un flacon de 2 litres, surélevé et muni d'une sortie d'écoulement (type Pyrex 374). Sur le tuyau de caoutchouc reliant le tube de verre et le flacon, le débit est réglé par une pince de Mohr à vis. L'admission d'air dans le flacon de 2 litres est réalisée par une tubulure munie d'un coton pour filtrer les poussières. Tout l'ensemble est au préalable stérilisé à l'autoclave.

Il n'y a pratiquement jamais eu de contamination pendant une perfusion. Par contre, il est assez difficile de régler le débit de telle manière que l'écoulement se fasse très lentement, toujours à la même vitesse.

L'expérience a été menée à bien à plusieurs reprises pendant 8 jours. Mais pour établir des comparaisons en réalisant de nombreuses séries

de cultures, il faudrait que le temps de perfusion puisse être réglé sans défaillance pendant un mois.

Les perfusions permettent d'éliminer les substances de déchet, mais aussi d'introduire des substances nouvelles pendant la croissance. J'ai seulement réalisé quelques perfusions avec de l'eau distillée, des milieux P E PH ou P E Hy PH, ou des solutions de $1 \cdot 10^{-6}$ g/l de cystéine. Les résultats de ces expériences dans les chapitres suivants sont mentionnés à titre de comparaison.

Les mêmes problèmes se posent en ce qui concerne le volume gazeux situé au-dessus du milieu de culture.

Dans les essais que j'ai réalisés en atmosphère confinée, les souches d'*Achlya flagellata* sont toujours restées stériles, l'étude du déterminisme de la reproduction est alors impossible.

Les cultures sont donc faites normalement en milieu confiné et en atmosphère renouvelée. Les mesures de tension d'oxygène réalisées dans des milieux témoins de 15 jours, 1 mois 10 jours, 2 mois 8 jours, 7 mois, donnent toujours des valeurs désignées par l'expression « saturation en oxygène » : il y a équilibre entre l'oxygène dissous dans les milieux et l'oxygène de l'air atmosphérique.

IV. — LA MESURE DE LA TENSION D'OXYGÈNE

1° L'appareillage de mesure en atmosphère confinée et ses inconvénients.

L'emploi d'un appareillage manométrique de type Warburg ne se prête guère aux expériences entreprises. D'une part, l'agitation permanente des milieux de culture perturbe le développement végétatif des filaments mycéliens. D'autre part, il faudrait cultiver le Champignon pendant plusieurs mois dans un appareillage hermétiquement fermé; le Champignon serait rapidement en anoxybiose.

Dans toutes les expériences que j'ai réalisées avec l'*Achlya flagellata* souche R dans des conditions d'anaérobiose même imparfaites, le Champignon devient stérile au point de vue de la reproduction sexuée et même parfois au point de vue de la reproduction asexuée.

2° L'appareillage utilisé et l'aspect relatif des mesures.

J'ai utilisé le « Moniteur pour la mesure de l'oxygène en biologie », modèle Y S I 53, importé par Paris-Labo, et fabriqué par la Société Yellow-Springs Instrument dans l'Ohio. Cet appareil permet de mesurer la tension d'oxygène dans les liquides par une méthode électrométrique, à l'aide d'une sonde polarographique. Il fonctionne normalement avec des accessoires, et en particulier un enregistreur permettant d'étaler plus ou moins les variations de potentiel électrique.

Etant donné les conditions expérimentales choisies, et dans le but d'améliorer les conditions de lecture, j'ai installé à la place de l'enregistreur un galvanomètre amplificateur à index lumineux et à résistances variables, modèle G 225, fabriqué par la Société A.O.I.P. de Paris.

La sonde polarographique type 5331 est suffisamment sensible pour obtenir un bon usage du galvanomètre; il suffit de vérifier régulièrement l'étalonnage de l'appareil. La sonde est généralement fournie avec des membranes en téflon destinées à des mesures à 37° C environ dans les laboratoires médicaux. Je l'ai équipée avec des membranes spéciales n° 5937, également à base de téflon, pour réaliser des mesures à 23° C.

En utilisant une résistance appropriée du galvanomètre, la marge de lecture sur le cadran se trouve étalée sur 125 graduations. Ce montage ne modifie pas la sensibilité de la sonde, mais il permet une plus grande précision de lecture. Après de multiples essais l'appareillage a fonctionné normalement. J'ai fait plusieurs mesures pour chaque valeur retenue, en calculant la moyenne lorsque cela était nécessaire. En outre, j'ai réalisé, généralement le même jour, les mesures dans les milieux témoins et dans les milieux de culture.

Les mesures sont ensuite calculées en pourcentage de saturation. La saturation est représentée par 100 % (fig. 13). Cette valeur est établie en plaçant l'électrode dans le milieu témoin largement aéré depuis plusieurs jours, conformément à l'étalonnage prévu par le constructeur. Elle signifie qu'il y a équilibre entre l'oxygène dissous dans le milieu témoin et l'oxygène de l'air libre, à la concentration normale et à la pression atmosphérique.

Etant donné les conditions expérimentales nécessaires pour obtenir une reproduction sexuée, les mesures effectuées ne correspondent pas à des valeurs absolues. Pendant le développement des cultures, la surface du liquide où vit le Champignon est à l'air libre, il n'est donc pas possible de mesurer la consommation totale d'oxygène.

D'ailleurs cette mesure n'est pas fondamentale, étant donné les problèmes qui se posent.

Lorsque le milieu est au contact de l'air, ce qui est mesuré provient de la différence entre l'oxygène utilisé par le Champignon et l'oxygène atmosphérique qui se dissout simultanément dans le milieu. C'est parce qu'il y a pratiquement une grande différence entre la vitesse d'utilisation et la vitesse de diffusion de cet oxygène que les mesures donnent des résultats utilisables.

La vitesse de diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture est faible (O. RAHN et G. L. RICHARDSON, 1941; G. A. TRUESDALE, A. L. DOWNING et G. F. LOWDEN, 1955). CL. LIORET (1963) précise qu'elle est trois cent mille fois moins élevée dans l'eau à 25° que dans l'air. Mais en outre elle varie en fonction de la différence de tension en oxygène entre le milieu et l'air. Lorsque le milieu est pauvre en oxygène, la vitesse de diffusion atteint son maximum, mais elle reste toujours

faible relativement à la vitesse de consommation, car dans les cultures de 1 mois, lorsque la consommation d'oxygène est à son maximum, l'oxygène présent dans le milieu représente seulement 28 % de l'oxygène contenu dans les milieux témoins saturés en oxygène.

TABLEAU III. — CONCENTRATION EN OXYGÈNE
EXPRIMÉE EN POURCENTAGE DE SATURATION (1),
DANS 8 SÉRIES DE CULTURES DE TYPE P E Hy PH, MESURÉES A DES ÂGES DIFFÉRENTS

P E Hy PH	4,5	5,5	6	6,7	7,5	7,9
13 jours.....	97	94	92	97	94	94
18 jours.....	72	70	68	64	60	57
25 jours.....	36	35	44	43	40	40
1 mois 11 jours.....	28	40	44	48	52	60
1 mois 25 jours.....	44	52	56	60	58	64
2 mois 5 jours.....	48	57	64	68	76	76
3 mois 8 jours.....	76	76	76	72	76	76
7 mois	97	94	94	96	92	94

(1) Ce terme est défini dans le texte (chapitre A, IV.2).

Afin de remédier à ces difficultés j'ai fait des mesures de tension d'oxygène dans des milieux témoins préparés le même jour et mesurés le même jour que les milieux de culture. Les valeurs portées sur les figures 12, 13, 14 et le tableau III sont les différences entre les mesures faites dans les milieux de culture et les milieux témoins. Elles indiquent les consommations d'oxygène, mais sans tenir compte des vitesses de diffusion qui varient en fonction inverse de la tension d'oxygène dans le milieu. Pour les faibles tensions la consommation est sous-estimée, mais par ailleurs nous savons que dans ces conditions la respiration est faible (L. PLANTEFOL, 1935; CL. LIORET, 1963).

V. — LES SOLUTIONS TAMPONS ET LA MESURE DU pH

Il existe de nombreux mélanges tampons (A. BRUNEL, 1948). J'ai utilisé :

- le tampon phosphate de SÖRENSEN;
- le tampon universel de BRITTON et ROBINSON (n° 1);
- le tampon véronal de MICHAELIS.

1° Le tampon phosphate de Sørensen.

Les solutions à base de phosphate monopotassique $K H_2PO_4 \frac{M}{15}$ et de phosphate disodique $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O \frac{M}{15}$ sont souvent employées en microbiologie et en mycologie. Elles présentent l'avantage de ne pas

introduire un trop grand nombre d'ions différents dans le milieu de culture. Elles permettent un développement normal de l'*Achlya flagellata* souche R, même à de fortes concentrations.

Les produits Prolabo RAL purs sont utilisés. Le phosphate monopotassique ne pose pas de problèmes particuliers, mais le phosphate disodique $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ne correspond pas au phosphate employé par SÖRENSEN. Dans la pratique j'utilise la méthode de J. A. KOLMER et F. BOERMER (1945), également conseillée par M. HUYBRECHTS (1947).

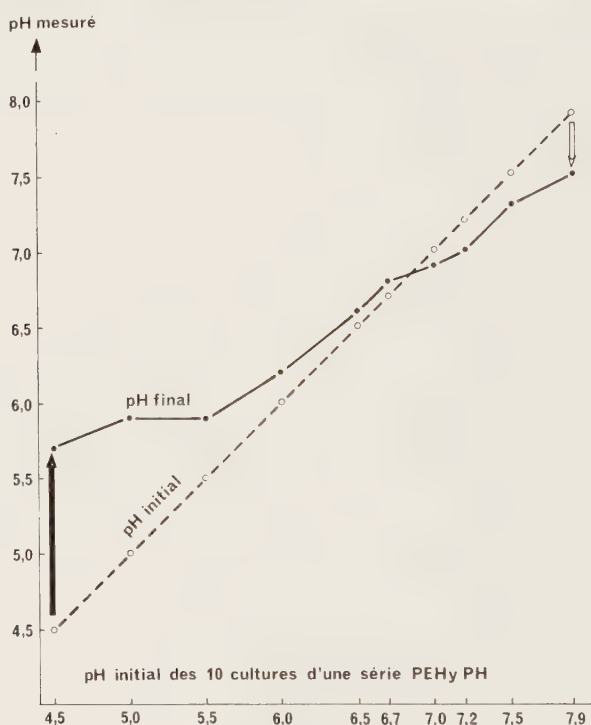


Fig. 1. — Variations du pH dans des cultures P E Hy PH vieilles de 3 mois.

Toutes les solutions, une fois préparées, sont vérifiées par la méthode électrométrique. Les mélanges tampons sont préparés conformément aux tables, mais dans ce mémoire, ce qui importe, ce sont les variations des milieux de culture. Seules les valeurs données par le potentiomètre sont retenues et les milieux sont désignés d'après le pH qu'ils ont 24 heures après leur préparation et leur stérilisation.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre équipé d'une électrode au Calomel (Hg-HgCl) et d'une électrode de verre sensible de pH 0 à pH 9,5. L'étalonnage de l'appareil est régulièrement vérifié. Les milieux préparés dans les mêmes conditions et pendant plusieurs années donnent les mêmes valeurs. Les différences de mesure sont de

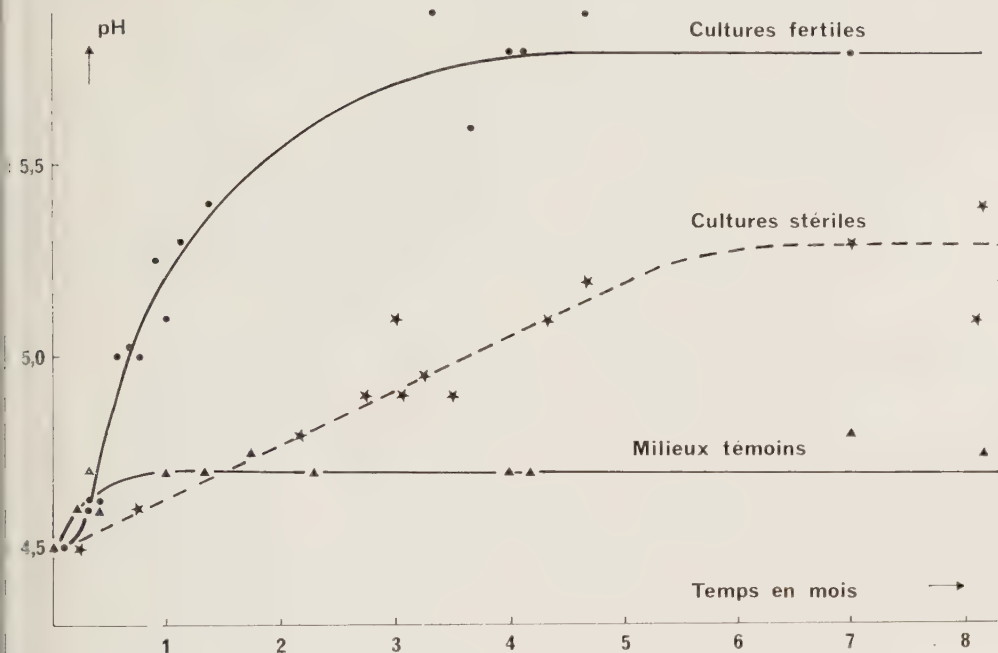


FIG. 2. — Evolution du pH des milieux P E Hy PH 4,5.

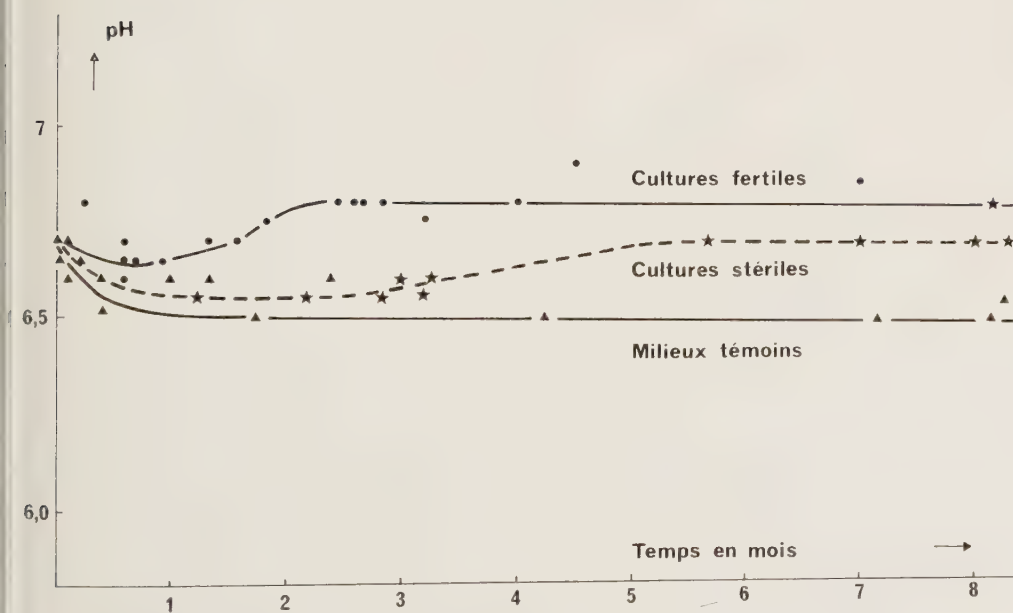


FIG. 3. — Evolution du pH des milieux P E Hy PH 6,7.

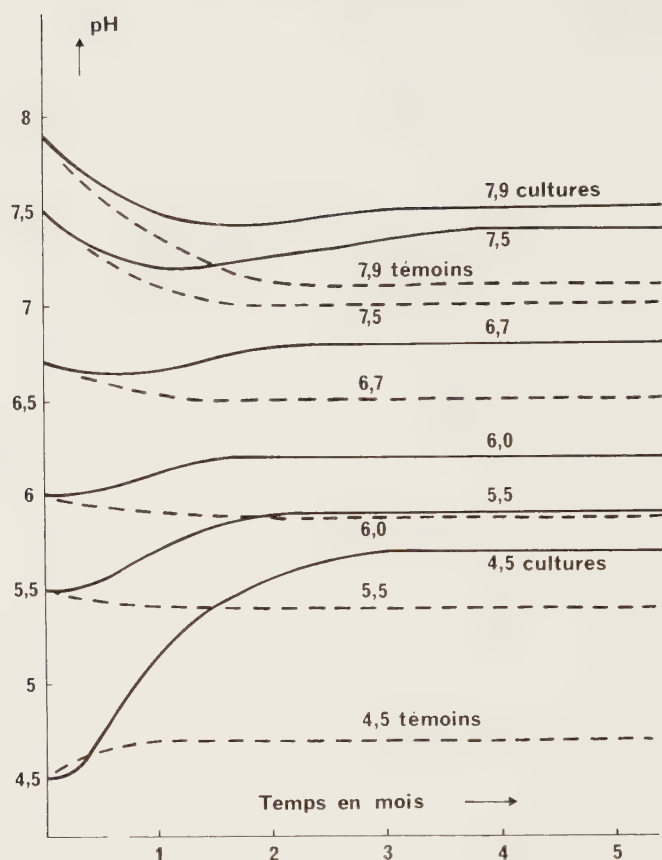


FIG. 4. — Comparaison du pH des milieux témoins T P E Hy PH et des milieux de culture P E Hy PH.

l'ordre de $\pm 0,1$ unité de pH. Les figures 2, 3, 4, 5 montrent les variations du pH en fonction du temps, dans des milieux témoins stérilisés à l'autoclave et sans ensemencement. Ces variations sont analysées au chapitre B, I.

Afin de remédier à cet état de fait, des solutions tampons ont été préparées à l'avance soit 15 jours, soit 1 mois avant leur emploi. Ceci dans le but de les utiliser seulement après leur stabilisation. Il est apparu que cela ne changeait guère les résultats. Les substances diffusant du bois ou les substances des milieux nutritifs jouent un rôle dans cette relative instabilité des milieux tamponnés et en particulier des milieux basiques.

Cette instabilité est sous la dépendance de plusieurs facteurs. Les milieux témoins, de même que les cultures, sont placés dans une étuve réglée à 23° , ce qui accélère les réactions. Dans presque toutes les expériences les solutions tampons sont diluées de moitié, ce qui abaisse leur

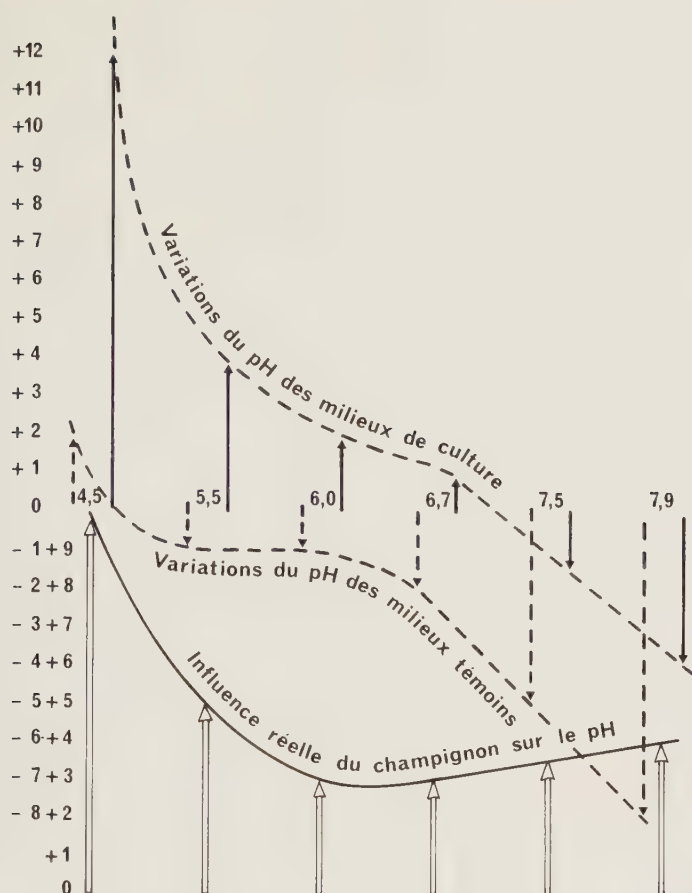


FIG. 5. — Variations du pH exprimées en 1/10 d'unité pH à partir du pH initial.

capacité tampon. Mais cela permet d'introduire d'autres corps dans les milieux et de réaliser des cultures en séries. Le même mélange tampon peut être réparti dans plusieurs séries d'erlenmeyers et en particulier dans les milieux témoins. (S'il fallait préparer autant de mélanges que d'erlenmeyers les risques d'erreurs augmenteraient.)

Le facteur le plus gênant est la variation de la capacité tampon en fonction du pH. Cette question est connue (J. SMALL, 1946).

Dans des milieux à différents pH la résistance aux variations du pH n'est pas la même. Lorsque le pH est au voisinage du pK, le milieu a son maximum de stabilité. Dans les tampons phosphates de SÖRENSEN ce sont les pK de l'acide phosphorique qui interviennent.

C'est en particulier le pK₂ correspondant à la dissociation $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{--} + \text{H}^+$ qui intervient pour les valeurs de pH correspondant aux cultures. La bonne efficacité de ce mélange tampon est valable

entre pH 5,6 et pH 8,0. Il ne faut donc pas être surpris si les variations mesurées pour les milieux de pH 4,5 sont plus importantes que les variations mesurées pour les pH voisins de la neutralité. La capacité tampon des phosphates est très faible pour pH 4,5 et pH 8,5 (J. SMALL, 1946).

J'ai mesuré la capacité tampon des milieux de culture de type P E Hy PH vieux de 8 jours, à l'aide d'une burette graduée et du potentiomètre, et construit une courbe voisine de la courbe de J. SMALL (1946). Le nombre de millilitres de soude NaOH $\frac{N}{10}$ nécessaire pour faire varier le milieu de culture de 0,1 unité pH passe par un maximum pour pH 6,8-7,0. Pour des milieux de pH 6,8 il faut environ 2 ml de soude $\frac{N}{10}$ pour obtenir une variation de 0,1 unité pH, alors qu'il suffit de 0,6 ml pour obtenir la même variation des milieux de pH 4,5.

Il faut noter que du gaz carbonique CO_2 se dissout dans le milieu, en provenance de l'air atmosphérique et du métabolisme du Champignon. Il entraîne une acidification non négligeable (J. SMALL, 1946).

Les mélanges tampons de SÖRENSEN introduisent dans les milieux de culture un nombre d'ions limité.

Les ions PO_4H^{--} et PO_4H_2^- peuvent être utilisés dans de nombreuses réactions du métabolisme, mais comme ils sont en excès, leur influence doit être la même dans toutes les cultures. Ils ne doivent pas fausser les comparaisons, ni être toxiques (J. L. INGRAHAM et R. EMERSON, 1954).

Il n'en est pas de même pour les ions K^+ et Na^+ dont les proportions varient beaucoup dans les différents milieux. Ces ions interviennent dans les mécanismes d'échanges, au niveau des membranes (E. J. CONWAY, 1953-1955).

C'est pour répondre à ces questions soulevées par l'antagonisme entre les ions Na^+ et les ions K^+ , et aussi pour vérifier les résultats obtenus avec les tampons phosphates, qu'il a paru nécessaire d'utiliser également d'autres tampons.

2° *Le tampon véronal de Michaelis.*

Les tampons phosphates employés contiennent une proportion de plus en plus grande d'ions Na^+ dans les milieux basiques et, à l'inverse, une proportion de plus en plus grande d'ions K^+ dans les milieux acides. Un phénomène de perméabilité et de toxicité peut donc intervenir (A. BERKALOFF, J. BOURGUET, P. FAVARD et M. GUINNEBAULT, 1967; M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, 1967).

Afin de supprimer ce problème, le tampon véronal de MICHAELIS semble indiqué. Il permet, en outre, de vérifier le comportement du Champignon dans les milieux basiques sans introduire dans la culture un trop grand nombre d'ions différents.

Le tampon de MICHAELIS préparé d'après les tables (L. LISON, 1953) ne contient que de l'acide chlorhydrique $\text{HCl} \frac{\text{M}}{10}$ et du véronal sodique $\frac{\text{M}}{10}$. Il contient du véronal, c'est-à-dire un diéthylbarbiturate dérivé de l'acide malonique, dont l'action biologique aurait pu se traduire par une inhibition. Le malonate inhibe la succino-déshydrogénase (H. BEEVERS, 1952; G. TURIAN, 1962).

Il ne semble pas que ce type d'inhibition soit en cause, car le Champignon se développe et se reproduit bien dans des milieux où le tampon est seulement dilué de moitié. Il n'y a pas d'antagonisme entre des ions K^+ et des ions Na^+ .

Les résultats obtenus avec les tampons au phosphate et les tampons au véronal sont superposables. Donc l'abondance des ions phosphoriques et la proportion variable d'ions K^+ et d'ions Na^+ n'influencent pas la reproduction du Champignon.

Contrairement à ce qui se passe chez des Levures (NGUYEN THI LAU, 1966), où la méiose est contrôlée par des ions K^+ , il ne semble pas que cette question se pose dans le déterminisme de la sexualité de l'*Achlya flagellata*. C'est la concentration en ions H^+ dans les milieux de culture qui contrôle ce déterminisme.

3° Le tampon universel de Britton et Robinson.

Le tampon universel de BRITTON et ROBINSON, tampon I, contient de la soude $\frac{\text{M}}{5}$ et un mélange d'acide phosphorique, d'acide acétique, d'acide borique. La Société Rhône-Poulenc fournit ce mélange acide, préparé à partir de composés purs, produits RAL.

Les mélanges tampons ont été préparés conformément aux tables (A. BRUNEL, 1948), ils présentent l'avantage de donner des solutions allant de pH 1,8 à pH 11,9, mais ils présentent des inconvénients. Ils se sont révélés toxiques pour l'*Achlya flagellata* à des concentrations de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$. A ces concentrations, quel que soit le pH, la croissance du Champignon est nulle.

Il faut diluer dix fois le tampon BRITTON et ROBINSON pour permettre une croissance du Champignon, ce qui abaisse considérablement la capacité de ce tampon.

Ce tampon n'a pas permis d'étudier la reproduction, car toutes les souches placées en sa présence sont restées stériles.

L'acide borique est responsable de cette stérilité. TURIAN (1954-1955) utilise cet acide très dilué pour inhiber la reproduction sexuée et cultiver la phase gamétophytique pure d'*Allomyces Javanicus* en milieu d'INGRAHAM et EMERSON; la libération et la copulation des gamètes sont inhibées.

L'introduction d'acide borique très dilué dans des milieux de type P E PH conduit aux mêmes résultats. Je peux donc confirmer l'action

inhibitrice de l'acide borique : les observations réalisées sur des Blastocladales se reproduisent chez des Saprolegniales.

Le tampon universel de BRITTON et ROBINSON permet de chercher les valeurs extrêmes du pH compatibles avec la croissance du Champignon (voir chap. C, I). A la limite, l'examen microscopique montre généralement que la souche est vivante, mais si l'observation macroscopique ne permet pas de déceler une croissance, il est difficile de savoir si le Champignon s'est développé.

Le fait que la capacité tampon du milieu est faible présente alors des avantages. Une faible activité du Champignon entraîne une grande variation du pH, ce qui confirme les limites.

Pour les valeurs basiques du pH la stabilité des tampons BRITTON et ROBINSON, dilués dix fois, n'est pas meilleure que la stabilité des tampons phosphatés dilués de moitié.

4° Les différentes façons d'utiliser les solutions tampons.

a) Attitude prise par les différents auteurs et critique.

Le rôle des ions H^+ dans la vie des Saprolegniées est généralement abordé d'une façon accessoire, soit par des écologistes (A. LUND, 1934; P. E. PERROT, 1960; M. W. DICK, 1963; R. E. ROBERTS, 1963), soit par des taxonomistes ou des physiologistes (voir la bibliographie dans les chapitres suivants).

Il est probable que beaucoup d'auteurs ont renoncé à approfondir cette question à cause de l'instabilité des milieux de culture malgré l'usage de solutions tampons.

Souvent les auteurs ajustent le pH au début des expériences pour obtenir le pH voulu. La valeur du pH est précisée dans le même esprit que la concentration des différents constituants du milieu, souvent il s'agit de pH 6,8 ou 7.

Remarquons cependant que l'introduction d'un acide aminé, comme la cystéine à des concentrations différentes, modifie le pH du milieu; même lorsque le but n'est pas d'étudier les variations du pH, celui-ci devrait toujours être vérifié.

Souvent il s'agit d'expériences dont la durée ne dépasse pas 8 jours.

Beaucoup d'auteurs mesurent le pH au début puis à la fin de leurs expériences, sans étudier toutes les variations dans le temps.

D'autres auteurs réajustent périodiquement le pH pour limiter les variations. Cette méthode multiplie les risques de contamination et elle n'assure pas réellement la stabilité.

Le passage brutal de pH 6,5 à pH 7 perturbe certainement les équilibres ioniques qui s'établissent entre les vacuoles, le cytoplasme et le milieu extérieur. Par exemple, M. LEFÈVRE (1952) montre qu'une Algue libère dans un milieu neuf une partie de ses productions métaboliques, par diffusion rapide : il se réalise probablement une sorte d'équilibre

entre le milieu extérieur et la cellule. Donc chaque réajustement de pH correspond à un léger mais brutal changement de milieu qui peut avoir à chaque fois des répercussions physiologiques.

Les attitudes variées adoptées par les auteurs sont liées à la diversité des recherches poursuivies.

b) Attitude prise dans ce travail et critique.

Au lieu de chercher à s'opposer aux variations du pH des milieux de culture en fonction du temps, il me semble préférable d'avoir une attitude toute différente et de laisser évoluer naturellement ces milieux. Les perturbations lors des réajustements sont ainsi évitées.

Dans ce mémoire, afin de pouvoir dégager des conclusions, les variations des milieux témoins sont étudiées avec autant de soins que les variations des milieux ensemencés. Tous les résultats sont exprimés en comparaison des milieux témoins. Dans ces conditions, les faiblesses présentées par les solutions tampons se trouvent en partie compensées.

D'autres problèmes demeurent : les constituants d'un milieu de culture ne sont pas dans le même état chimique pour des pH très différents; c'est le cas par exemple des acides aminés. Le Champignon est donc ensemencé dans des milieux de composition légèrement différente selon les différents pH. La complexité de cette question est telle que nous ne l'aborderons pas. Il faudrait renoncer à faire varier le pH (E. W. SIMONS, 1950; W. ARMSTRONG et A. ROTHSTEIN, 1964).

VI. — LA MESURE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION

1° L'appareillage utilisé et les conditions de mesure.

J'ai utilisé un pH-mètre modèle PS.13 de la Société Heito (Paris), muni d'une électrode de platine et d'une électrode au calomel (Hg-HgCl) à concentration normale.

Pour déterminer chaque valeur de potentiel, j'ai noté toutes les 5 minutes environ les valeurs données par l'appareil, et cela pendant au moins une heure. Après une chute rapide effectuée en 10 à 20 minutes les valeurs se stabilisent de manière asymptotique. Des mesures répétées pendant 2 ou 3 heures n'apportent pas de modifications.

Le palier obtenu traduit un état d'équilibre entre les substances électro-actives du milieu et les électrodes.

J'ai nettoyé régulièrement les électrodes avec beaucoup de soin, en faisant plusieurs rinçages à l'eau distillée et parfois en utilisant les indications de F. LABEYRIE (1963).

Les mesures réalisées pendant plusieurs années sur 48 séries de cultures de type P E Hy PH, composées de 6 erlenmeyers, permettent

de tracer les courbes des figures 7, 8, 9, 10, 11, 12 avec une certaine garantie. Les écarts enregistrés pour des milieux de même pH et de même âge ne dépassent guère 20 millivolts.

Il faut compter un nombre équivalent de mesures dans des milieux

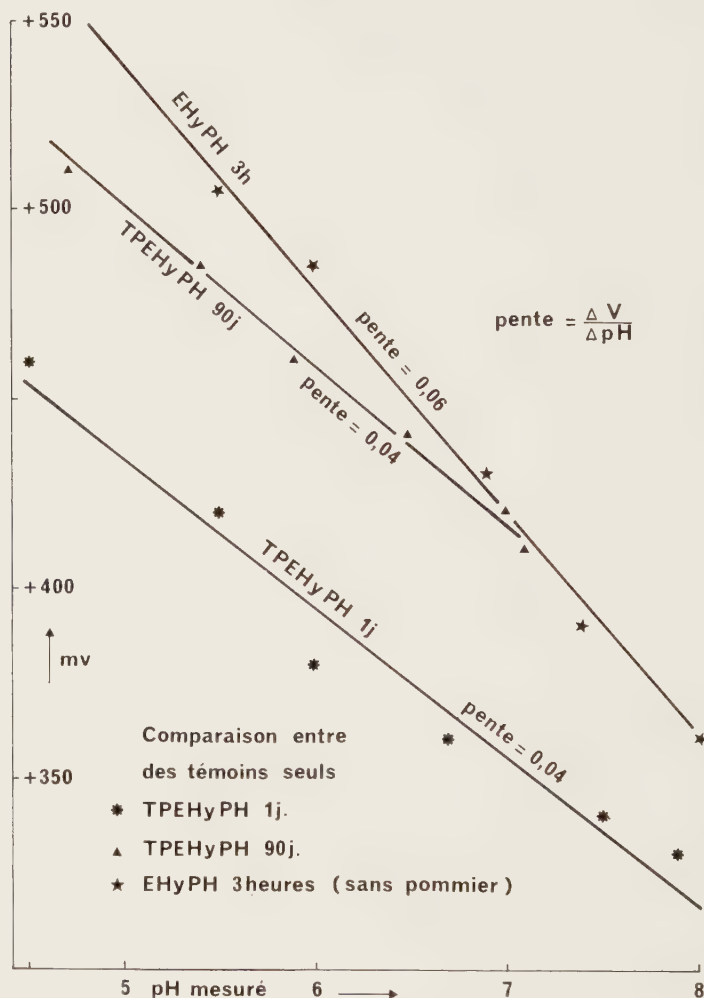


FIG. 6. — Potentiels mesurés dans des milieux témoins.

de composition plus ou moins différente, destinés à servir de contre-expérience et qui ne sont pas portés sur ces courbes.

Après étalonnage de l'appareil, puis vérification du tarage des électrodes, toutes les valeurs se rapportant aux mesures réalisées dans ce travail sont corrigées en ajoutant +280 mV afin de les faire correspondre au zéro de l'électrode de référence à hydrogène. J'ai souvent arrondi les valeurs à ± 5 millivolts près.

Sauf indications contraires, les mesures sont réalisées en présence d'air, dans le milieu de culture débouché juste au moment de la mesure, sans agitation.

Quelques mesures ont été réalisées en introduisant les électrodes dans l'erlenmeyer au moment de l'ensemencement, en chambre à ultra-

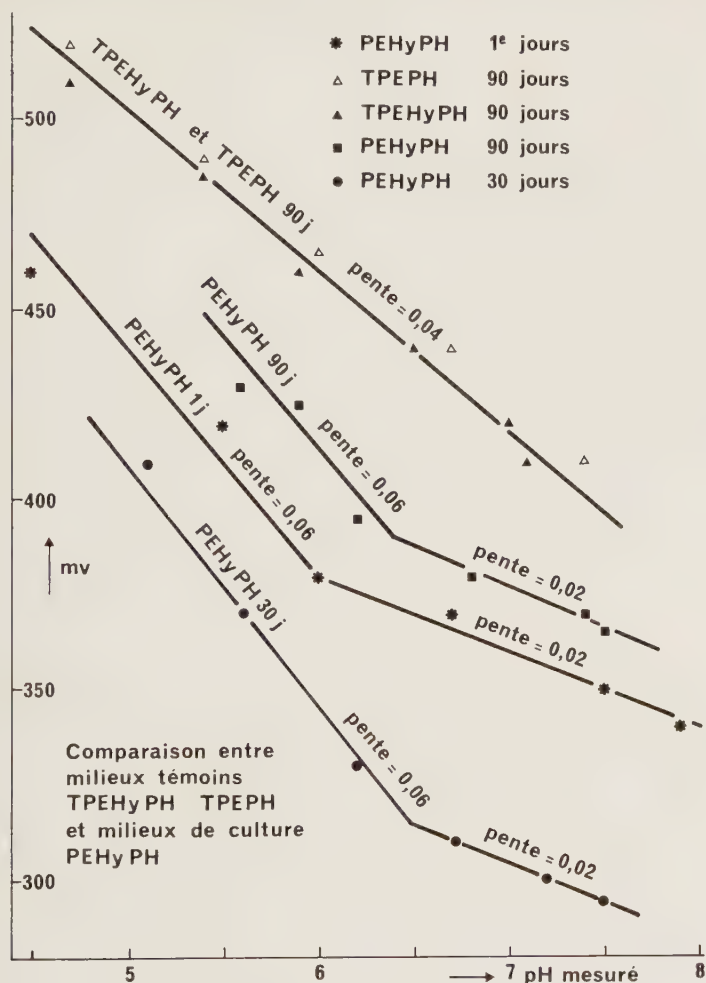


FIG. 7. — Potentiels mesurés dans des milieux témoins et des milieux de culture.

violet, après lavage à l'alcool puis à l'eau stérilisée. Les électrodes restant dans le milieu de culture, le fil de raccordement a permis de faire des mesures régulièrement. Ainsi j'ai pu faire des mesures dans le milieu de culture en présence du Champignon en croissance.

Elles se confondent avec les mesures obtenues en introduisant les électrodes au moment de l'examen.

Les courbes des figures 7, 8, 9, 10, 11 représentent le potentiel tel qu'il s'établit en présence d'oxygène, c'est-à-dire dans des conditions compatibles avec la vie prolongée et la sexualité du Champignon.

D'autres mesures présentées au paragraphe A, VI.5 sont réalisées en faisant passer un courant d'azote pur dans le milieu au moment de l'examen. Elles sont incompatibles avec la vie du Champignon.

2° L'électro-activité des milieux de culture.

Tous les milieux de culture mentionnés dans ce mémoire permettent d'obtenir une valeur stable en présence des électrodes de platine et de calomel.

Dans le cas d'extraits de bois (LÉVY-HULOT, 1946; L. E. WISE, 1946; R. LATOUR, 1957) il y a des glucides, des acides organiques, etc., et en particulier de nombreux polyphénols. L'analyse de composés phénoliques dans les feuilles, les fruits et l'écorce du Pommier (A. H. WILLIAMS, 1960) montre qu'il s'agit souvent de combinaisons entre des phénols et des glucides.

L'ensemble des substances électro-actives du milieu donne une résultante mesurable. Des mesures globales de potentiel sont souvent réalisées dans l'industrie de la bière, dans l'industrie sucrière ou laitière (M. DÉRIBÉRE, 1949), en présence de mélanges de substances aussi complexes que celui d'un milieu de culture de type P E PH. Les exemples de mesures dans des milieux complexes ne manquent pas.

Des mesures de potentiel Red-Ox ont souvent été réalisées dans des milieux de culture de Bactéries ou de Champignons. La bibliographie est abondante sur ce sujet (R. WURMSER, 1930; M. DÉRIBÉRE, 1949; L.F. HEWITT, 1950, 6° éd.).

Des déterminations du $r\text{ H}_2$ par la méthode colorimétrique ont été réalisées dans des extraits végétaux variés (A. MAYER et L. PLANTEFOL, 1928) et dans des milieux de culture de Champignons (R. GAUTHERET, 1939; A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET, 1946). Elles correspondent à une détermination de potentiel limite.

Le potentiel de milieux témoins T P E Hy PH 6,7 et T P E Hy PH 7 mesurés 3 heures après la stérilisation, lorsque la température est revenue à 25°, garde la même valeur lorsqu'il est mesuré avec un courant d'azote ou sans courant d'azote (voir chap. A, VI.5). Il est de +350 mV pour pH 6,7 et +340 mV pour pH 7.

3° L'introduction d'hydroquinone.

a) Intérêt biologique.

L'introduction d'hydroquinone dans les milieux de cultures n'est pas favorable à la croissance végétative. J'ai cherché à utiliser la concentration maximale sans apporter de troubles visibles à la vie du Cham-

pignon. La concentration de $0,5 \cdot 10^{-6}$ grammes par litre convient, mais des concentrations supérieures conduisent rapidement à la stérilité et à un arrêt de croissance. R. TRUHAUT et G. DEYSSON (1957) fixent la dose mortelle pour les cellules à $1,33 \cdot 10^{-6}$ M.

Après plusieurs séries d'expériences sans incidences sur la sexualité, j'ai utilisé l'hydroquinone pour la raison suivante : dans les milieux P E PH 6,7, l'indice de la sexualité est seulement de 10 pour les oogones fertiles, alors qu'il est de 66 dans les milieux P E Hy PH 6,7 (voir chap. C). La présence d'hydroquinone renforce l'action du milieu sur le Champignon.

Cette question a déjà été entrevue par J. N. COUCH (1945), d'après A. W. ZIEGLER et B. LINTHICUM (1950). Ces derniers auteurs ont montré qu'une élévation de la concentration en extraits de feuilles de Chêne stimule la production de zygotes mûrs. Or les quinones abondent dans ces conditions.

Les quinones combinées à des glucides, chez les Pommiers par exemple, ont peut-être pour effet de lutter contre les Champignons parasites (J. B. PRIDHAM, 1960).

La benzoquinone est un accepteur de protons H^+ et d'électrons e^- , c'est aussi pour cette raison que je l'ai employée. Etant donné l'écologie des Saprologniées qui vivent dans des milieux plus ou moins réducteurs, il était intéressant de réaliser des expériences voisines de celles de P. REISS et E. VELLINGER (1929) ou de E. FAURÉ-FRÉMIET, M^{me} LÉON, A. MAYER et L. PLANTEFOL (1929).

b) Influence de la concentration.

L'introduction d'hydroquinone dans les milieux, à la concentration de $\frac{M}{2} 10^{-6}$, ne modifie pratiquement pas le potentiel du milieu. C'est le jus extrait du rameau de Pommier, en partie sous l'effet de la stérilisation à l'autoclave, qui impose son potentiel. Les mesures effectuées dans les mêmes conditions avec des milieux P E PH conduisent aux mêmes valeurs. Ce n'est pas surprenant, car la concentration en hydroquinone est faible. L'introduction d'un mélange comprenant 50 % d'hydroquinone et 50 % de quinone, à la même concentration, ne change également rien aux valeurs du potentiel.

A forte concentration les valeurs sont très différentes. J'ai mesuré le potentiel d'un mélange à la concentration $\frac{M}{2}$, comprenant 50 % d'hydroquinone et 50 % de quinone, dans un tampon phosphate pH = 7, à 23°. J'ai obtenu avec l'électrode au calomel un potentiel de +0,5 mV, soit, après correction par rapport à l'électrode à hydrogène, un potentiel $E'o = +285$ mV. C'est-à-dire une valeur comparable à celle des autres auteurs (W. M. CLARK, 1960).

c) Influence de la stérilisation et du rameau de Pommier.

Des solutions préparées avec de l'hydroquinone $\frac{M}{2} 10^{-6}$ dans des tampons phosphates (solution E Hy PH), mesurées à l'air sans stérilisation, quelques heures après la préparation, donnent une représentation graphique linéaire dont la pente calculée en volts par unité de pH est régulière $\frac{dV}{dpH} = 0,06$ (voir fig. 6).

Après introduction d'un rameau de Pommier et stérilisation à 120° pendant 20 minutes à l'autoclave, les mesures de potentiel des milieux témoins T P E Hy PH montrent que la pente devient $\frac{dV}{dpH} = 0,04$. Cette modification provient des nombreux constituants extraits des rameaux de Pommier. Ensuite la pente des droites ne change pas, quel que soit l'âge du milieu.

d) Les différentes dissociations suivant le pH.

Les problèmes théoriques sur l'hydroquinone seule et le mélange hydroquinone-quinone sont connus (E. BILMANN, 1921-1927; L. MICHAELIS, 1929; R. WURMSER, 1930-1964; R. LABEYRIE, 1963).

4° L'évolution du potentiel des milieux de culture.

a) Les milieux de culture P E Hy PH ont des propriétés électro-actives voisines de celles de l'hydroquinone.

Ce sont peut-être les polyphénols du rameau de Pommier qui sont responsables du potentiel d'oxydo-réduction. On sait que les anthraquinones sont très répandues chez les végétaux supérieurs (RIBEREAU-GAYON, 1968).

H. MUSSO (1967) note que les potentiels des dérivés de substitution de l'hydroquinone s'échelonnent au-dessus de celui de l'hydroquinone. Ce serait une indication, mais comme le pourcentage des formes réduites et des formes oxydées n'est pas connu dans les milieux de culture, il est impossible de chercher à préciser.

b) Les figures 8, 9, 10 montrent que le potentiel des milieux témoins T P E Hy PH évolue rapidement pendant le premier mois.

La première idée qui vient à l'esprit est qu'il s'agit d'une oxydation du milieu. Dans ce cas, les substances réductrices se transforment pendant le premier mois qui suit la stérilisation. Il y a peut-être des oxydations de glucides (N. MAYER et R. WURMSER, 1929; N. MAYER, 1929) et des oxydations de polyphénols.

Les phénols-oxydases sont répandues chez les végétaux y compris chez les Champignons (W. O. JAMES, 1953; J. H. BURNETT, 1968). Il se forme des dérivés colorés (C. BOGDANSKI, 1950). Les oxydations peuvent

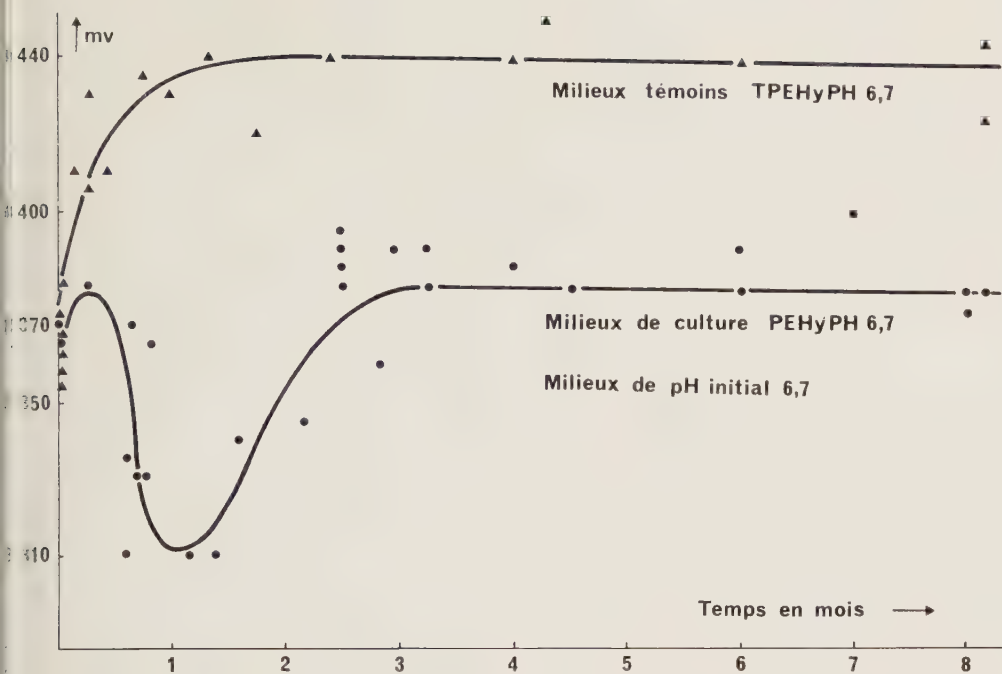


FIG. 8. — Evolution du potentiel en fonction du temps.

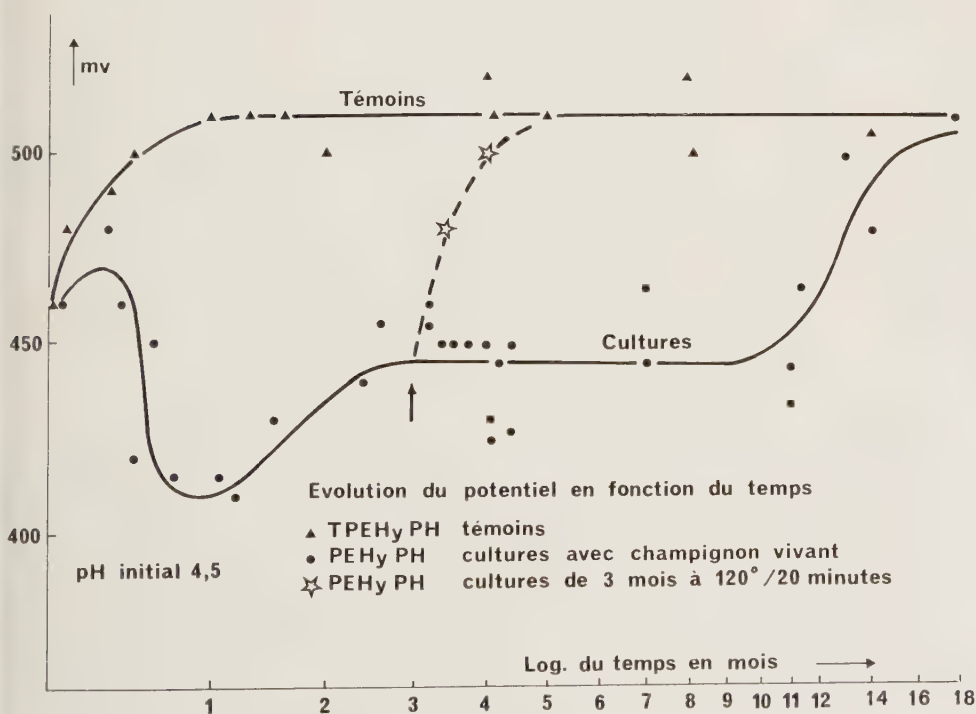


FIG. 9. — Evolution du potentiel en fonction du temps.
Influence de la stérilisation à l'autoclave sur des cultures âgées de 3 mois.

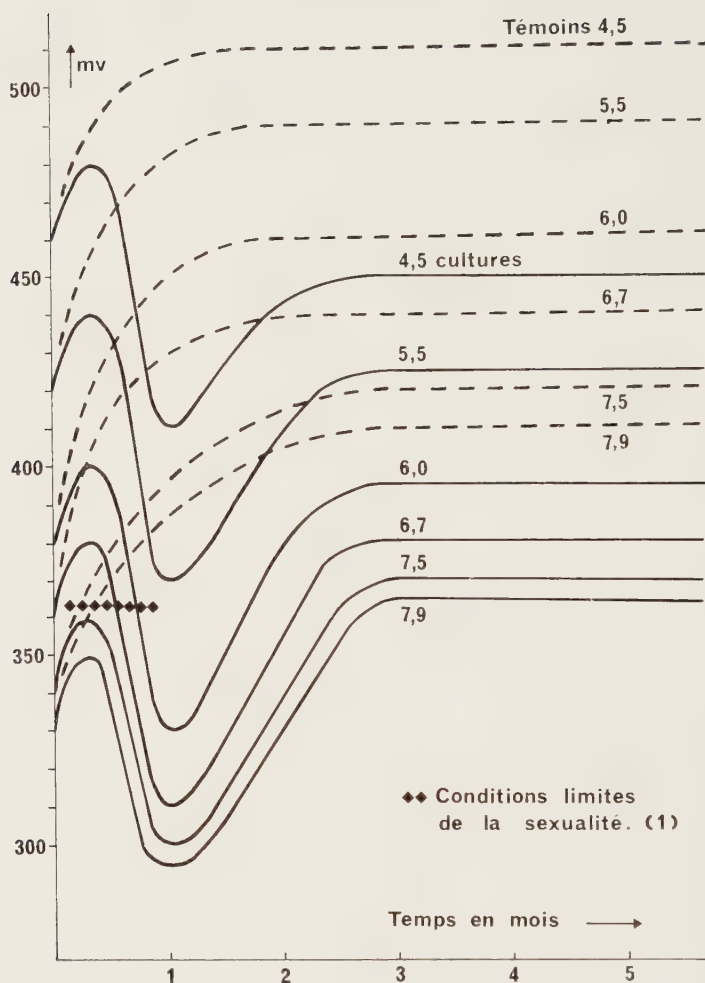


FIG. 10. — Comparaison du potentiel des milieux témoins TPEHy PH et des milieux de culture P EHy PH. Conditions limites de la sexualité (1) pendant la période d'induction et la fécondation.

conduire à des réactions complexes (W. I. TAYLOR et A. R. BATTERSBY, 1967) voisines par exemple des réactions qui, partant de la tyrosine, aboutissent à la mélanine (P. KARLSON, 1964).

c) La comparaison des figures 6 et 7 montre que la présence du Champignon provoque une rupture de pente dans les courbes. Pour les pH plus acides que 6 la pente $\frac{dV}{dpH} = 0,06$; pour les pH moins acides que 6 la pente $\frac{dV}{dpH} = 0,02$.

Bien que cette question soit étudiée dans les chapitres suivants, il est intéressant de noter que cette rupture de pente existe encore 90 jours après l'ensemencement. Elle disparaît lorsque le Champignon

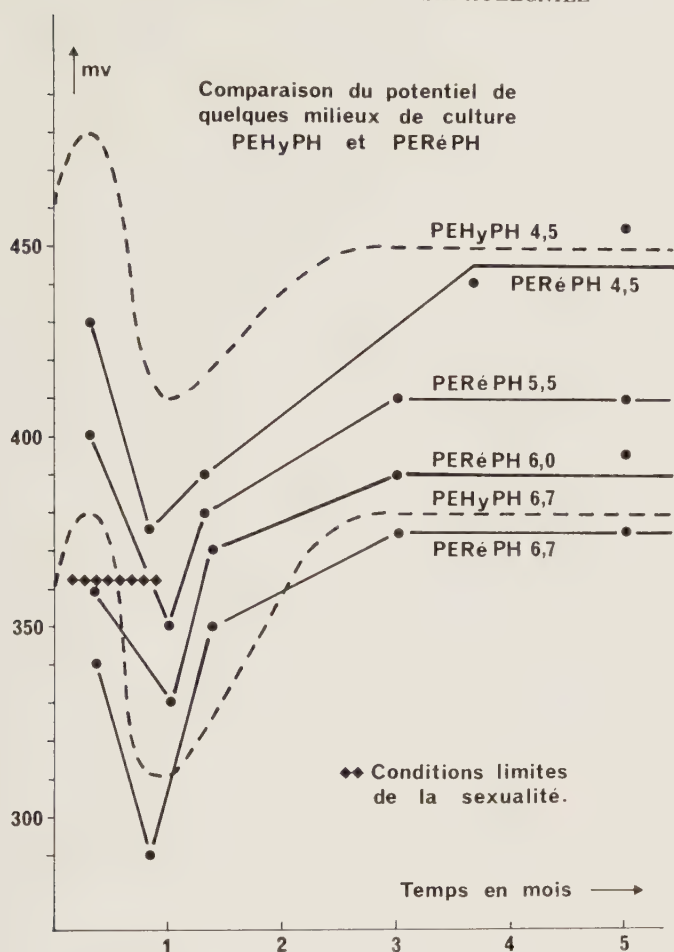


FIG. 11. — Evolution du potentiel dans des milieux de culture contenant de la réductose et conditions limites de la sexualité.

étant tué par une stérilisation à l'autoclave, le potentiel des milieux de culture rejoint le potentiel des milieux témoins (fig. 9).

C'est une des manifestations de l'activité réductrice du Champignon, qui est peut-être la conséquence d'une variation dans le métabolisme.

Il faut peut-être rapprocher de cette constatation le fait que, en solution alcaline, avec l'oxygène comme agent oxydant, de la quinone et du peroxyde d'oxygène sont formés (H. Musso, 1967). Donc un changement peut se produire dans le milieu.

Cette rupture de pente n'apparaît pas dans les milieux témoins T P E Hy PH.

Au bout de 3 mois le potentiel est pratiquement stabilisé, des mesures effectuées dans des milieux témoins vieux de 11 mois le confirment.

La comparaison entre les courbes des milieux témoins pendant le premier mois et les courbes des milieux de culture après le premier mois, c'est-à-dire lorsque cesse la croissance du Champignon, montre nettement que les mêmes phénomènes doivent se reproduire dans les deux cas. Ces oxydations sont indépendantes de toute synthèse organique du Champignon.

5° Mesure du potentiel d'oxydo-réduction sous courant d'azote.

a) Différents aspects de l'influence de l'oxygène sur le potentiel.

L'électrode de platine est sensible à la « pression d'électrons » qui règne dans le milieu. Mais en présence d'oxygène les mesures sont parfois difficiles à interpréter (R. WURMSER, 1930; W. M. CLARK, 1960).

J. E. KEMPF et P. SAYLER (1946), dans des cultures d'*Actinomyces* dont le potentiel initial varie entre +310 mV et +375 mV, montrent que plus le taux d'aération est grand, plus le potentiel mesuré s'élève.

Dans les milieux P E Hy PH, où le Champignon se développe et se reproduit en présence d'oxygène, quatre types de facteurs, au moins, peuvent agir sur la mesure du potentiel.

1° Les substances électro-actives, telles que le couple hydroquinone-quinone dans lequel l'oxygène n'intervient pas, ne soulèvent de difficultés que si l'on cherche à préciser le rapport des formes oxydées et des formes réduites et si l'on veut tenir compte de l'influence des phénol-oxydases.

Les mêmes difficultés sont rencontrées lorsqu'il s'agit d'interpréter les mécanismes de la chaîne respiratoire (B. CHANCE et G. R. WILLIAMS, 1956).

Nous admettons que l'ensemble des substances électro-actives donne un potentiel d'oxydo-réduction qui caractérise le milieu à un moment donné.

2° Les figures 8, 9, 10, 11 montrent que le potentiel s'élève rapidement pendant le premier mois dans les milieux témoins, et pendant le deuxième mois dans les milieux de culture. Il s'agit probablement du temps nécessaire pour que s'installe un équilibre dynamique résultant des différentes réactions chimiques entre les corps présents dans le milieu.

Si des substances électro-actives entrent en combinaison avec l'oxygène, l'évolution du potentiel est liée au fait que ce ne sont plus les mêmes corps qui sont en présence. Il ne faut pas exagérer l'importance de ces transformations. La mesure du potentiel est possible, car la vitesse de ces réactions, qui durent pendant plus d'un mois, n'affecte pas l'équilibre qui s'établit au moment de la mesure.

3° *Dans les milieux où il se développe*, le Champignon rejette certainement des protons H^+ et des électrons e^- comme le font les Levures (E. J. CONWAY, 1946 et 1950).

Le milieu PE Hy PH, qui contient de la benzoquinone et d'autres quinones, fonctionne alors comme un accepteur : ceci facilite l'excrétion des protons H^+ et des électrons e^- par le mycélium. L'électrode enregistre les variations du potentiel sous l'action réductrice du Champignon. L'examen des graphiques montre que le développement du Champignon est suffisant pour annuler les effets de l'oxydation du milieu entre le 10° et le 30° jour.

Mais comme simultanément le Champignon consomme de l'oxygène le problème se pose de savoir quel est le facteur dominant.

4° *L'oxygène, en présence de catécholase* ou d'acide ascorbique-oxydase, peut se trouver ionisé (P. KARLSON, 1964) $O_2 + 4e^- \rightarrow 2O^{--}$. En présence de protons il se forme de l'eau.

Cet oxygène peut jouer un rôle actif au niveau de l'électrode et entrer en compétition avec les protons et les électrons. S'il intervient dans l'établissement du potentiel mesuré, l'électrode peut se comporter comme une électrode à oxygène et être sensible aux variations de la concentration en oxygène, par exemple entre le 8° et le 30° jour dans les cultures.

Dans le cas des milieux témoins, la saturation en oxygène est réalisée 3 jours après la stérilisation. Elle n'influe pas de façon notable sur la mesure du potentiel qui évolue beaucoup plus lentement, pendant 1 mois dans les milieux acides, pendant 2 mois dans les milieux basiques. Entre le 1^{er} et le 3^e jour, qu'il y ait peu ou beaucoup d'oxygène, les mesures du potentiel ne varient guère. Par contre, elles varient beaucoup entre le 3^e et le 30^e jour, alors que la concentration en oxygène est stable. Il n'y a donc pas de similitude entre l'évolution du potentiel mesuré et l'évolution de la concentration en oxygène.

Dans le cas des milieux de culture les conditions sont plus complexes. La concentration en oxygène est variable pendant le développement du Champignon. La variation du potentiel entre le 8° et le 30° jour est peut-être la conséquence de cette variation de la concentration en oxygène. La comparaison des figures 10, 13 et 14 conduit à cette hypothèse. C'est pourquoi un certain nombre de mesures ont été faites sous un courant d'azote, dans le but de chasser l'oxygène au moment de la mesure.

Chaque fois qu'il est difficile de lever les incertitudes, j'emploie simplement le mot de *potentiel* : il s'agit alors du potentiel mesuré globalement, c'est-à-dire du potentiel d'oxydo-réduction du milieu dont la mesure est plus ou moins modifiée par l'oxygène présent.

Chaque fois que le rôle de l'oxygène est éliminé, j'emploie le terme de *potentiel d'oxydo-réduction*.

Il serait souhaitable que tous les auteurs fassent cette distinction et ne portent pas sur le même graphique des mesures réalisées dans des conditions différentes, sans attirer spécialement l'attention des lecteurs sur ce détail.

*b) Résultats des mesures sous courant d'azote
dans les milieux témoins.*

Les mesures sont d'abord faites par la méthode habituelle dans l'ermeyer incliné, non agité, débouché juste au moment de la mesure.

Ensuite un courant d'azote pur est envoyé au voisinage des électrodes grâce à un tube de verre. L'azote provient d'une bouteille (modèle gaz rares de la Société l'Air Liquide), il barbote à grand débit dans le milieu en entraînant l'oxygène.

La mesure, en général, n'aurait pas besoin de durer plus d'une demi-heure, car l'aiguille du potentiomètre se stabilise assez vite. Mais pour être certain que le potentiel est bien stable, le débit d'azote est laissé pendant une heure.

Donc, dans un milieu donné, deux mesures sont faites successivement (fig. 12).

La comparaison de ces deux mesures permet d'avoir une idée de l'influence de l'oxygène sur l'électrode. Il est certain que tout l'oxygène n'est pas éliminé. Il faudrait un appareillage plus compliqué et d'autres conditions de mesure. L'influence des traces d'oxygène qui peuvent rester est négligeable par rapport à la marge d'erreurs de 10 mV acceptée pour les autres mesures.

Dans un milieu témoin T P E Hy PH refroidi, mesuré 3 heures après la stérilisation à l'autoclave, la chute de potentiel est nulle lors du passage d'un courant d'azote. Le milieu n'a pas le temps de se réoxygéner complètement avant un délai de 3 jours.

Les mêmes mesures réalisées dans des milieux témoins 4 et 5 jours après la stérilisation montrent que le potentiel du milieu baisse de 50 mV en moyenne en présence d'un courant d'azote pur.

Au bout de 12 jours la chute du potentiel est de 40 mV. Elle est de 20 mV au bout de 23 jours. La modification du potentiel est pratiquement nulle dans des milieux témoins de 1 mois et de 8 mois.

Donc la présence d'oxygène influence l'électrode dans les milieux témoins fraîchement préparés. Mais dans les milieux âgés d'un mois et davantage, le potentiel s'établit indépendamment de l'oxygène présent.

*c) Résultats des mesures sous courant d'azote
dans les milieux de culture.*

Dans les milieux où le Champignon se développe, les chutes de potentiel oscillent entre 10 mV et 45 mV pour les cultures P E Hy PH vieilles de 3 jours à 12 jours. Pour une culture vieille de 23 jours, la chute de potentiel est de 15 mV. Pour des cultures de 26 jours, 30 jours, 1 mois

12 jours, la chute de potentiel est nulle. Ces valeurs sont portées sur la figure 12 pour des milieux de pH initial 6,7. Les mêmes résultats sont obtenus avec les milieux ayant d'autres pH.

La courbe obtenue grâce aux mesures faites sous courant d'azote permet de déterminer le potentiel d'oxydo-réduction des milieux de culture au moment où se réalise la croissance du Champignon. Cette courbe rejoint la valeur minimale de la courbe du potentiel mesuré en l'absence de courant d'azote.

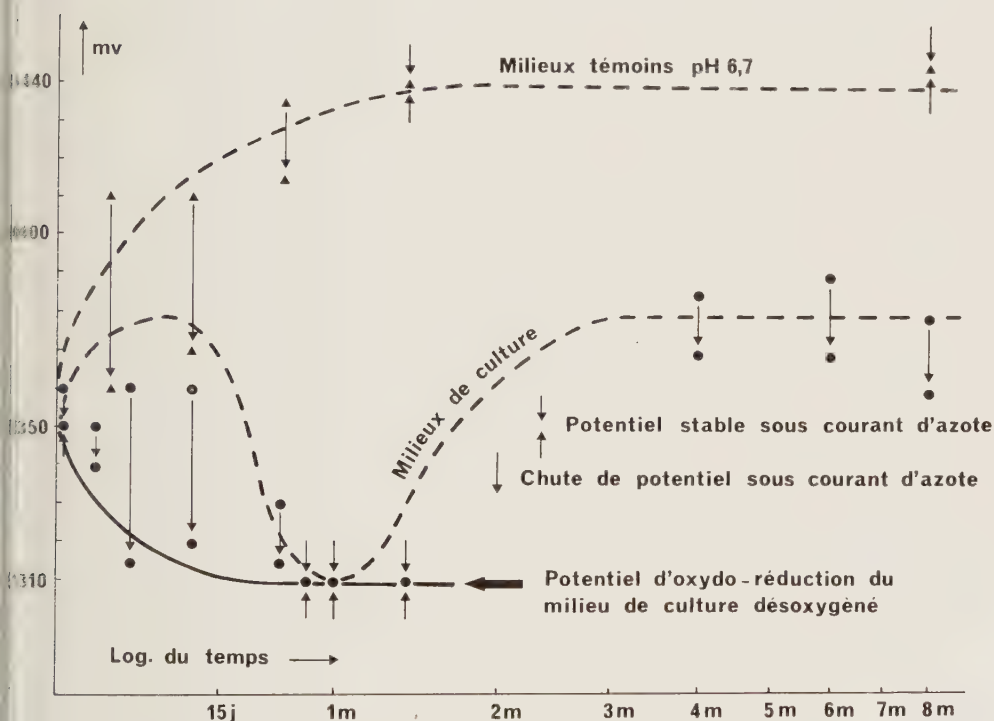


FIG. 12. — Modification du potentiel mesuré sous l'influence d'un courant d'azote dans des milieux P E Hy PH 6,7.

Dans les cultures vieilles de 1 mois, le Champignon a fortement réduit la concentration en oxygène dans le milieu (fig. 13). La consommation d'oxygène est à son maximum. Les valeurs mesurées dans les cultures correspondent à la fois au potentiel du milieu où vit réellement le Champignon et au potentiel d'oxydo-réduction.

Les courbes obtenues ressemblent beaucoup à celles représentées par L. F. HEWITT (1931).

Les mesures montrent qu'il existe des substances imposant un potentiel d'oxydo-réduction dans les milieux P E Hy PH. L'influence de l'oxygène au niveau de l'électrode est limitée. Elle est de l'ordre de 20 à 50 mV.

Dans les cultures d'un âge supérieur à 3 mois, les chutes de potentiel vont de 0,5 mV à 20 mV, en présence d'un courant d'azote. Donc le potentiel en présence du Champignon est moins stable que dans les milieux témoins.

6° Essais avec d'autres substances électro-actives.

Dans le but de constituer des milieux ayant un potentiel différent pour une valeur donnée du pH, j'ai introduit d'autres substances électro-actives dans les milieux de base de type P E PH ou dans des milieux de BARKSDALE.

J'ai utilisé de la thio-urée, de la cystéine, de l'acide ascorbique, du bleu de méthylène à la concentration très faible de $1 \cdot 10^{-6}$ g ou $1 \cdot 10^{-5}$ g; car la reproduction ou le développement ne supportent pas de fortes concentrations. Dans ces conditions, il est probable que les substances libérées par les rameaux de Pommier jouent un rôle essentiel, car le potentiel reste toujours voisin de celui des milieux P E Hy PH, comme le montrent les graphiques. En outre, le Champignon doit garder sensiblement la même activité réductrice dans ces différents milieux.

Les résultats de ces cultures apportent des compléments ou posent des problèmes qui sont étudiés dans les chapitres C et D.

Dans l'industrie de la bière, pour lutter contre l'oxygène, on utilise la réductone (M. DÉRIBÉRÉ, 1949). C'est un mélange d'oses dont les propriétés ont été étudiées par R. WURMSER et N. MAYER (1935). Dans quelques séries de cultures j'ai employé une préparation voisine, la réductose, fournie par l'Institut Pasteur de Paris en ampoules stériles de 10 ml. La réductose est utilisée pour abaisser le potentiel Red-Ox dans les cultures de Bactéries anaérobies (A. R. PRÉVOT, 1960).

J'ai employé la réductose à des concentrations assez faibles de $1 \cdot 10^{-4}$ ou $1,5 \cdot 10^{-4}$, car dans ces conditions il y a une faible reproduction sexuée dans les milieux acides. Pour une concentration plus forte il n'y a pas de reproduction sexuée. Les résultats sont étudiés aux chapitres C et D.

7° Potentiel et anaérobiose.

Lorsqu'ils sont placés en anaérobiose, les organismes aérobie abaisser le potentiel de leur milieu de culture jusqu'à une limite de -200 mV environ (L. F. HEWITT, 1931; R. WURMSER, 1937), alors que les organismes anaérobies peuvent imposer un potentiel limite beaucoup plus négatif (E. AUBER, E. AUBERTIN et L. GENEVOIS, 1929). Les travaux de G. B. REED et J. H. ORR (1943) sont démonstratifs à cet égard. Partant d'un milieu sans substances réductrices, dont le potentiel s'établit à +250 mV, ou d'un milieu contenant du thioglycollate de Na dont le potentiel s'établit à -200 mV, l'inoculation d'une souche de

Clostridium en anaérobiose abaisse le potentiel à -400 mV dans les deux cas. C'est un potentiel limite.

Les mesures de E. J. CONWAY et R. P. KERNAN (1955) sur des levures en anaérobiose correspondent à un autre problème. Dans le milieu de culture sans colorants, le potentiel s'établit à environ $+180$ mV à pH 4,5. Alors qu'en présence de phénol indo-2-6-dichlorophénol le potentiel s'établit à environ $+320$ mV et à environ $+50$ mV en présence de bleu de Nil, ceci en une heure de culture. Il est net que le milieu prend un potentiel qui est contrôlé par les colorants. Conformément aux observations de R. K. CANNAN, B. COHEN et W. M. CLARK (voir R. WURMSER, 1930), les colorants fonctionnent comme accepteurs d'hydrogène et tampons d'oxydo-réduction tant qu'ils ne sont pas totalement réduits.

La stabilisation d'un potentiel a donc deux aspects, d'abord l'influence réductrice maximale d'un organisme, ensuite la capacité du milieu à changer de potentiel.

Dans les milieux P E Hy PH, les diphénols jouent un rôle de transporteurs entre l'organisme et l'oxygène.

La détermination d'un potentiel limite par les colorants d'oxydo-réduction n'est pas simple. A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET (1940-1946) ont montré que les Champignons passent d'abord par une période de latence très variable suivant les espèces et le milieu. Les colorants peuvent s'accumuler dans les vacuoles, puis il y a réduction et excrétion des colorants. Souvent, lorsque la décoloration des vacuoles est achevée, la croissance commence. La comparaison des résultats obtenus avec le *Saccharomyces ellipsoideus* et le *Saprolegnia diclina* montre que les Levures se développent beaucoup plus vite et beaucoup plus activement que les Saprolégniales. Les résultats liés à la croissance, qui se chiffrent en heures, 3 heures par exemple chez les Levures, se chiffrent en jours chez les Saprolégniales.

Pour le *Saprolegnia diclina*, GUILLIERMOND et GAUTHERET sont conduits à admettre que le rôle principal est tenu par des substances réductrices excrétées par le Champignon. La réduction des colorants est lente et ne dépasse pas la réduction du vert Janus à l'état de dérivé rose. GAUTHERET (1939) montre que le Champignon abaisse fortement le potentiel du milieu extérieur, même en l'absence de colorant. Je pense que, dans ce cas, d'autres substances électro-actives du milieu constitué par une décoction de soja peuvent jouer un rôle d'accepteur d'hydrogène, de même que dans les milieux P E Hy PH par exemple.

Il est normal que le potentiel descende sous l'influence réductrice d'une Saprolégnée. En aérobie il pourrait théoriquement descendre jusqu'à -200 mV environ et rester stable. Dans les milieux P E Hy PH aérés après un mois de culture il remonte. La croissance du Champignon est arrêtée. L'activité réductrice du Champignon diminue, ce qui s'accompagne d'une baisse de la consommation d'oxygène. L'oxygénation du milieu est alors possible, la courbe s'élève de la même manière que la courbe des milieux témoins (fig. 8, 9, 10).

Même en anaérobiose, il arrive que le potentiel remonte spontané-

ment. E. J. CONWAY et R. P. KERNAN (1955) observent ce phénomène chez des Levures dans un milieu ne contenant pas de colorant d'oxydo-réduction. Cette hausse est commandée par le métabolisme de la Levure. L'activité réductrice est liée à une perte d'électrons e^- et à la libération des ions H^+ dans le milieu. E. J. CONWAY montre que cette libération est importante pour +220 mV et pratiquement nulle pour +100 mV. Cela correspond sensiblement au point de rebroussement de son graphique.

Dans des cultures de Bactéries en gélose profonde, A. R. PRÉVOT et C. REINERT (1942) arrivent à des constatations analogues. Les Bactéries anaérobies du groupe II réduisent temporairement la safranine qui peut se recolorer après 2 semaines par exemple, alors que les Bactéries du groupe I réduisent définitivement la safranine. Dans les deux cas l'accès de l'oxygène est le même, bien que très ralenti par la gélose. Tout dépend de la durée de l'activité réductrice des Bactéries. L'allure de la courbe des Bactéries du groupe VI (A. R. PRÉVOT, 1960) n'est pas très différente de celle des courbes de type P E Hy PH, bien qu'il y ait une grande différence de r_{H_2} .

Les courbes des figures 8, 9, 10, 11, 12 ont la même forme que les courbes obtenues par L. F. HEWITT (1931) pour des Bactéries cultivées en milieux aérés; seule l'échelle du temps est différente.

Nous savons que les réactions des Saprologniées sont très lentes et se chiffrent en jours et en semaines, alors que chez les Levures les réactions se chiffrent en heures. Il ne faut pas oublier que la croissance des Saprologniées est linéaire et ne prend jamais une allure exponentielle.

Bien que les conditions expérimentales soient différentes dans les trois cas, je pense que les résultats obtenus dans les milieux P E Hy PH peuvent être comparés avec les résultats obtenus par L. F. HEWITT, A. R. PRÉVOT et par E. J. CONWAY, car au niveau des organismes les mêmes problèmes se posent. Il s'agit de rejeter des protons H^+ et des électrons e^- dans le milieu de culture.

Dans les milieux P E Hy PH, l'*Achlya flagellata* dispose d'oxygène qu'il utilise comme accepteur. Les Bactéries en gélose profonde sont carencées en oxygène. La Levure, dans les expériences de E. J. CONWAY, est rapidement privée d'oxygène. Dans tous les cas l'activité de ces organismes ne peut pas être indéfinie; après une phase de développement la croissance s'arrête. C'est alors que dans les trois exemples en question la hausse de potentiel après la chute est de l'ordre de +40 mV à +60 mV. Je pense que ce n'est pas une coïncidence. C'est un phénomène indépendant de la présence d'oxygène.

8° Conclusion.

Dans les milieux P E Hy PH, un équilibre s'établit, d'une part, entre l'activité réductrice du Champignon qui se traduit par la consommation d'oxygène, mais aussi peut-être par un rejet de substances réduc-

trices probablement comme chez les Levures (A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET, 1946; E. J. CONWAY, 1955) et, d'autre part, la diffusion de l'oxygène dans le milieu, en provenance de l'atmosphère.

Dans cet équilibre, les quinones du milieu jouent un rôle d'accepteurs et de vecteurs d'hydrogène entre le mycélium et l'oxygène, parallèlement à la possibilité d'une respiration directe avec l'oxygène dissous. La vitesse des échanges d'oxygène n'est pas instantanée dans le milieu et c'est pour cette raison que la mesure d'une consommation d'oxygène est possible.

Les mesures sous courant d'azote montrent que les mesures de potentiel ne sont guère affectées par la présence d'oxygène. Il existe un fort système oxydo-réducteur dans les produits issus des rameaux de Pommer. Celui-ci impose son potentiel d'oxydo-réduction au milieu. Le Champignon ne fait que le modifier.

Si les cultures étaient en anaérobiose, le potentiel d'oxydo-réduction baisserait beaucoup plus bas, mais ce serait un autre problème. L'*Achlya flagellata* souche R ne se reproduirait plus dans ces conditions. Les études sur le potentiel d'oxydo-réduction en anaérobiose sont déjà nombreuses, ce travail n'apporterait rien de nouveau. D'autre part, l'oxygénation contribue à maintenir le tampon oxydo-réducteur des cellules à son niveau physiologique (R. WURMSER, 1932).

B. — VARIATIONS DU pH ET DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DU MILIEU DE CULTURE SOUS L'INFLUENCE D'UNE SAPROLÉGNÉE

I. — RÉGULATION APPARENTE DU pH ET INFLUENCE RÉELLE DU CHAMPIGNON SUR LE pH

a) *Variations du pH des milieux de culture.*

La figure 1 a été établie à partir d'une série de type P E Hy PH comprenant dix milieux de culture de pH différents. Les valeurs du pH mesurées dans un premier lot, un jour après stérilisation, sont portées en abscisse, tandis que les valeurs du pH mesurées dans un second lot, après 3 mois de culture, sont portées en ordonnée.

La droite oblique représentée en pointillé a seulement un intérêt théorique. Elle représente les valeurs du premier lot, un jour après stérilisation. Elle permet de mettre en évidence le fait que les milieux les plus acides deviennent de plus en plus basiques, tandis que les milieux les plus basiques deviennent de plus en plus acides (voir les flèches de la figure 1).

Cet examen rapide laisse croire que le Champignon réalise partiellement une régulation du pH, mais une comparaison avec les variations des milieux témoins montre que cette idée est fausse.

L'étude de cette question a été poursuivie systématiquement à partir de milieux ayant pour pH initial 4,5 - 5,5 - 6 - 6,7 - 7,5 - 7,9 pendant plusieurs années. Parmi les souches de l'*Achlya flagellata* souche R, des lignées sont devenues stériles. Dans ce cas, l'influence du Champignon est moins nette, bien que le développement mycélien soit sensiblement aussi abondant que dans les cultures fertiles.

La figure 2 représente les variations des milieux de pH initial 4,5. Comme elles sont importantes, les trois courbes sont nettement séparées. Pour les milieux de pH initial différent les courbes sont davantage serrées, mais la courbe des cultures stériles est toujours située entre celle des milieux témoins et celle des cultures fertiles, par exemple pour les milieux P E Hy pH 6,7 (fig. 3).

La même étude réalisée pour les six valeurs initiales de pH conduit à l'établissement de la figure 4.

Presque tous les auteurs indiquent soit une élévation du pH des milieux de culture, par exemple H. S. REISCHER (1951), soit une baisse du pH des milieux de culture, par exemple L. MACHLIS (1953), mais l'étude des variations du pH des milieux témoins n'est pas faite.

b) Comparaison avec les variations des milieux témoins.

L'influence réelle du Champignon sur son milieu est en permanence masquée par l'évolution du milieu seul, telle qu'elle serait s'il n'y avait pas eu d'ensemencement.

Pour permettre d'apprécier quantitativement l'action réelle du Champignon en examinant les figures 2, 3, 4, il suffit d'affecter chaque variation de pH, entre le pH initial et le pH mesuré à un moment donné, d'un coefficient algébrique. Toute variation augmentant la valeur du pH reçoit le signe (+); dans ce cas le milieu devient plus basique. Toute variation diminuant la valeur du pH reçoit le signe (—); dans ce cas le milieu devient plus acide. L'influence réelle du Champignon est alors obtenue en faisant la somme algébrique des variations (apparentes) du milieu de culture et des variations (réelles) du milieu témoin. Ces valeurs concernant des cultures vieilles de trois mois, dont l'évolution est pratiquement terminée, sont reportées sur la figure 5.

Cette étude montre que le Champignon libère toujours des substances basiques, quel que soit le pH. On s'aperçoit que les variations sont plus faibles au niveau de pH 6,4, c'est-à-dire plus bas que le pK_2 de l'acide phosphorique. Il est probable que les autres substances du milieu interviennent dans cette question.

J'ai déterminé la capacité tampon des milieux de culture en réalisant des dosages à l'aide de soude $\frac{N}{10}$ et du pH-mètre. J'ai obtenu une courbe voisine de celle présentée par J. SMALL (1946).

La courbe montrant l'influence réelle du Champignon sur le pH, comparée à celle des variations de la capacité tampon, montre que les variations sont faibles lorsque la capacité tampon est forte, ce qui était prévisible.

c) La libération d'ammoniaque ou d'ions NH_4^+ .

Des essais avec le réactif de NESSLER et des comparaisons avec des témoins permettent de conclure que l'*Achlya flagellata* libère des ions NH_4^+ ou de l'ammoniaque comme le *Leptomitius lacteus* ou l'*Apodachlya brachynema* (A. L. SCHADE et K. V. THIMANN, 1940). La libération d'ammoniaque par certains Champignons est connue depuis longtemps (F. LABROUSSE et J. SAREJANNI, 1929). Elle pourrait conduire à une interaction entre deux Champignons (R. M. PAGE, 1959) provoquant la reproduction asexuée.

Pensant que la production d'ions NH_4^+ par le Champignon pouvait ensuite agir sur celui-ci, S. B. SALVIN (1942) a montré, après avoir employé de nombreux composés, qu'il ne fallait pas chercher un lien entre l'ion NH_4^+ et l'apparition d'un type donné de sporange.

Les conclusions qui se dégagent des cultures en milieux P E Hy PH sont du même ordre. La reproduction est très variable, bien que dans tous les milieux il y ait sensiblement le même dégagement ammoniacal.

La libération d'ammoniaque ou d'ions NH_4^+ est surtout intéressante au point de vue métabolique. Elle se réalise chez le *Leptomitius lacteus* par une désamination oxydative. Elle peut être annulée dans des conditions nutritives particulières (A. L. SCHADE et K. V. THIMANN, 1940).

D'après H. S. REISCHER (1951) et E. C. CANTINO (1966), l'*Achlya flagellata* serait capable d'assimiler les composés ammoniacaux pour assurer sa croissance. Mais cette question n'est pas simple (D. J. D. NICHOLAS, 1965; P. KARLSON, 1964; R. HELLER, 1969).

II. — INFLUENCE DU CHAMPIGNON SUR LA TENSION EN OXYGÈNE

1° Dans les milieux témoins.

Après la stérilisation le retour à la saturation en oxygène n'est pas immédiat. Il se réalise en 3 jours. Les mesures faites pendant les 3 premiers jours sont inférieures à la saturation. Ensuite la saturation en oxygène est acquise dans les différents milieux T P E Hy PH.

2° Dans les milieux de culture.

Il n'y a pas de différence de vitesse de croissance lorsque l'ensemencement est réalisé 1 jour ou 8 jours après la stérilisation du milieu. Lorsque la croissance du Champignon commence, le milieu est toujours saturé en oxygène.

La concentration en oxygène baisse lentement jusqu'au 13^e jour. Puis entre le 13^e et le 25^e jour, alors que la croissance s'achève, la diffusion d'oxygène depuis l'air ambiant est insuffisante pour compenser l'intense consommation d'oxygène par le Champignon, la concentration d'oxygène baisse rapidement (fig. 13, 14 et tableau III). Il est intéressant de noter que dans les milieux basiques, au 18^e jour, la consommation d'oxygène est plus intense que dans les milieux acides. Cela est inattendu, car dans les milieux basiques nous savons que la croissance

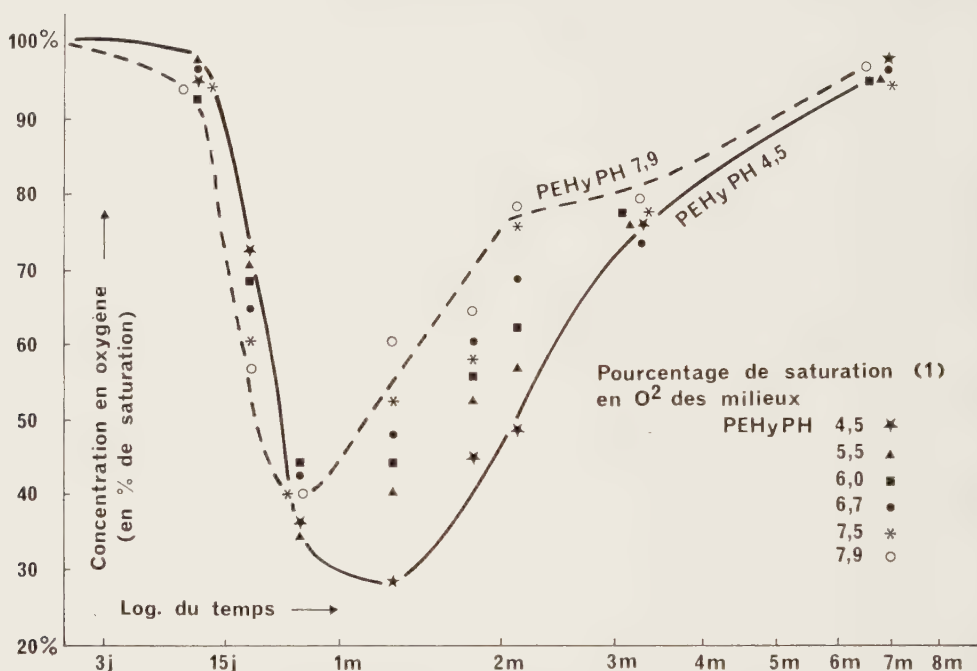


FIG. 13. — Pourcentage de saturation en O₂ des milieux de culture. La saturation (1) correspond à l'équilibre entre l'oxygène dissous dans les milieux témoins et l'oxygène présent dans l'air à la pression atmosphérique.

est plus lente. Cela ne semble pas dû à des variations expérimentales, car les valeurs sont dans un ordre régulier et les mesures ont été faites dans un ordre différent de celui du pH.

Au 25^e jour, dans tous les milieux P E Hy PH 4,5, l'intensité de la consommation d'oxygène atteint son maximum. Pratiquement, la consommation est la même, quelles que soient les valeurs du pH.

Par la suite il y a de grandes différences jusqu'au 90^e jour et ce sont les cultures en milieu acide qui consomment le plus d'oxygène, à l'inverse de ce qui se passe au 18^e jour. Les mesures réalisées dans des cultures de 2 mois 5 jours sont également bien ordonnées.

Entre le 3^e mois et le 7^e mois la consommation d'oxygène n'est pas nulle, mais elle décline régulièrement.

3° *Concentration en oxygène et fermentation.*

A 1 mois 11 jours, dans les milieux de pH 4,5, la concentration baisse jusqu'à 28 %, soit environ un quart de la saturation mesurée dans les milieux témoins en équilibre avec l'air normal.

Si l'on traduit cette valeur par rapport à la teneur en oxygène dans l'atmosphère naturelle, c'est-à-dire 21 %, $\frac{28}{100} = \frac{x}{21}$ donc $x = 5,88$. Cette valeur correspond à un mélange gazeux artificiel où il y aurait seulement 5,88 % d'oxygène, situé au-dessus du milieu de culture et en équilibre avec l'oxygène dissous dans le milieu. Cette valeur ne correspond probablement pas à des conditions qui conduisent à une fermentation.

L. PLANTEFOL (1935) a montré que pour les Levures il y a une nette variation du quotient respiratoire pour une tension de 5 % et une baisse des échanges gazeux (F. MOREAU, 1952). La respiration et la fermentation peuvent se succéder spontanément dans la vie de la Levure (L. PLANTEFOL, 1945).

Les Saprologéniales, par contre, ne semblent pas réaliser de fermentations (E. C. CANTINO, 1955). La teneur en oxygène est probablement un facteur limitant, en l'absence d'autres accepteurs d'hydrogène, pour la croissance végétative des Saprologéniales, ce qui peut expliquer l'absence de récolte dans les eaux profondes naturelles (F. K. SPARROW Jr., 1968).

III. — INFLUENCE DU CHAMPIGNON SUR LE POTENTIEL MESURÉ

1° *Les différentes étapes d'activité.*

Les figures 8, 9 permettent de découper la vie du Champignon en 5 périodes.

a) *Période de latence.*

Pendant les premiers jours, le potentiel du milieu de culture est dominé par l'évolution des substances contenues dans ce milieu (L. LUTZ, 1930).

Les trois premiers jours l'influence du Champignon est pratiquement nulle. L'examen microscopique de la souche montre que la croissance est insignifiante. Elle se manifeste par des filaments fins, d'un diamètre de 5 μ à 10 μ , parfois sinueux. Les valeurs mesurées en présence du Champignon et dans les milieux témoins se confondent.

b) Période de croissance débutante.

Entre le 3^e et le 8^e jour, des filaments de diamètre normal (25 μ -40 μ) se développent vigoureusement et la croissance véritable commence. Il faut attendre le 8^e jour pour que l'influence réductrice du Champignon soit suffisante pour s'opposer à l'évolution du milieu.

Pour les pH acides et neutres cette période ne dure jamais plus de 10 jours. Pour pH 7,9 il faut parfois attendre 15 jours pour voir commencer la croissance.

c) Période de fin de croissance.

Du 8^e au 30^e jour l'activité du Champignon s'accélère brutalement.

Une importante chute de potentiel s'accompagne d'une importante absorption d'oxygène.

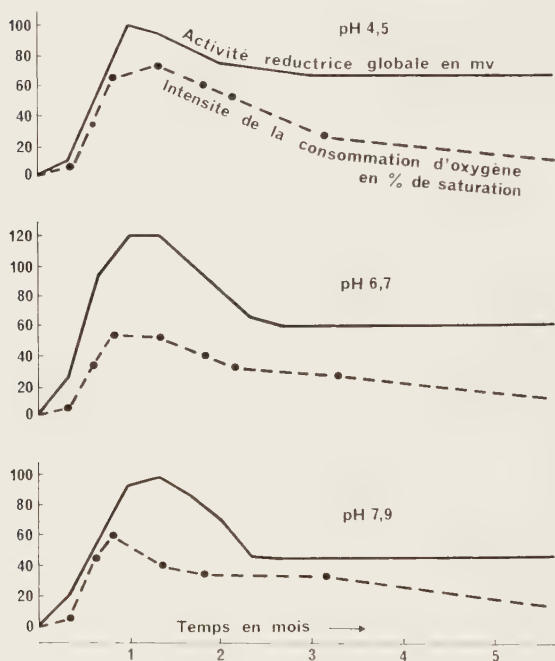


FIG. 14.

Comparaison entre l'activité réductrice mesurée et la consommation apparente d'oxygène.

Pour permettre d'exprimer des comparaisons, nous appellerons activité réductrice du Champignon l'ensemble des échanges avec le milieu, qui provoquent un abaissement du potentiel du milieu.

L'activité réductrice peut être exprimée par rapport à l'évolution des milieux témoins en faisant la différence point par point entre la courbe du potentiel des milieux témoins et la courbe du potentiel des milieux de culture.

Ces courbes sont tracées sur la figure 14, en même temps que les courbes d'intensité de la consommation d'oxygène.

Les graduations portées en ordonnée correspondent à deux échelles différentes. La courbe de l'intensité de la consommation en oxygène est exprimée en pourcentage de saturation : le zéro correspond à la saturation en oxygène et le nombre 100 correspond à l'anaérobiose. Pour les courbes de potentiel, les graduations expriment l'importance de l'activité réductrice en millivolts.

Du 8° au 15° jour, les premières anthéridies, puis les oogones se forment. C'est la période d'induction de la sexualité, pendant laquelle se déroulent les différentes étapes du mécanisme hormonal décrit par J. R. RAPER (1939-1950). Ce mécanisme a été étudié par A. W. BARKSDALE (1963), l'hormone A est un stéroïde oxygéné appelé anthéridiol (T. C. MORRIS et A. W. BARKSDALE, 1967). L'idée qu'il existe une hormone C est abandonnée (J. H. BURNETT, 1968). Ces questions sont actuellement l'objet de nombreux travaux (G. TURIAN et M. A. VISWANATHAN, 1966; G. TURIAN, 1969).

Puis du 15° au 30° jour, les reproductions sexuées et asexuées atteignent leur maximum d'intensité (fig. 20). Notons que vers le 15° jour les sporocystes sont nombreux à libérer leurs spores dans les milieux acides, puis leur activité diminue probablement sous l'effet de la concentration en produits de déchets (S. B. SALVIN, 1942).

Beaucoup d'oosphères sont bien formées, mais la reproduction sexuée n'est pas achevée. Elle se poursuit dans la phase suivante, d'où son nom.

d) Période de maturation.

Entre le 30° et le 90° jour, la forme des courbes rappelle celle des milieux témoins (fig. 10). Pour les milieux de pH 4,5 - 5,5 - 6,0 - 6,7 - 7,5 - 7,9, le potentiel remonte respectivement de +40 mV, +55 mV, +65 mV, +70 mV, 70 mV, 70 mV. Après avoir subi l'intense activité réductrice du Champignon le milieu reprend son évolution propre, mais il ne rejoint pas le potentiel des milieux témoins. C'est une période intermédiaire où le Champignon consomme encore de l'oxygène de façon appréciable.

Au début de cette phase de maturation le nombre des oosphères augmente encore. Les globules lipidiques et la double membrane des oosphères se délimitent. La paroi des oogones s'orne et brunit. Une activité métabolique tardive persiste. Elle correspond à une période de repos apparent indispensable avant la germination des zygotes.

Les cas de germination que j'ai pu observer dans les milieux P E Hy PH (non perfusés) se rapportaient toujours à des milieux vieux d'au moins 2 mois. Ce qui est conforme aux observations faites par de nombreux auteurs sur d'autres espèces (A. W. ZIEGLER, 1948).

e) Période de vie ralentie.

Après 3 mois commence une vie ralentie caractérisée par l'absence complète de croissance et de développement d'appareils reproducteurs. Le potentiel se stabilise jusqu'au 7° mois.

Dans le but de confirmer qu'il s'agit bien d'une activité du Champignon vivant, j'ai tué deux séries de souches par stérilisation à 120°. Les mesures faites 12 jours après stérilisation donnent des valeurs intermédiaires entre celles des souches en vie ralentie et celles des milieux témoins. Il faut attendre un mois avant d'obtenir des valeurs de potentiel égales à celles des milieux témoins (fig. 9).

Pour les pH 4,5 - 5,5 - 6,0, le Champignon exerce une activité réductrice de 60 à 65 mV et, pour les pH 6,7 - 7,5 - 7,9, il exerce des activités réductrices respectivement de 60, 50, 45 mV.

Il s'agit d'une activité énergétique de vie ralentie qui diffère de l'activité énergétique de croissance aérobie. Elle semble indépendante de la consommation d'oxygène, car la figure 14 montre que les courbes ne sont pas parallèles. La consommation d'oxygène baisse alors que l'activité réductrice est stable.

Comment interpréter l'existence d'un palier d'une durée de plusieurs mois, si ce n'est par l'existence d'un phénomène particulier ? On ne peut émettre que des hypothèses.

Le Champignon est toujours en aérobose mais il a peut-être modifié son métabolisme. A. L. SCHADE et K. V. THIMANN (1940) montrent que la production d'ammoniaque n'est pas un phénomène permanent et qu'il se produit par exemple lors de carences en glucides.

Le Champignon produit peut-être d'autres ions qui viennent agir sur l'électrode. E. J. CONWAY (1955) montre la diversité des ions qui traversent les membranes cellulaires et sont liés à un minimum d'échanges entre la cellule et le milieu ambiant.

Le Champignon excrète peut-être régulièrement des substances réductrices. C'est la conclusion de A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET (1946). Cette idée est discutée par L. F. HEWITT (1931).

Tant qu'une cellule est vivante, il existe un potentiel transmembranaire d'environ 50 mV (voir fig. 133 de ECCLES, dans A. BERKALOF, J. BOURGET, P. FAVARD, M. GUINNEBAULT, 1967). C'est peut-être la seule activité énergétique du Champignon en vie ralentie. Dans ce cas, elle se traduirait à l'extérieur du mycélium par une chute de potentiel également de l'ordre de 50 mV. Cette hypothèse me semble la plus plausible.

Dans les filaments mycéliens vieux de 3 ou 6 mois, j'ai rarement observé quelques courants cytoplasmiques. Mais la transplantation de filaments stériles dans des milieux neufs donne toujours un beau développement, donc le mycélium n'est pas mort. Il doit avoir une activité métabolique minimale.

f) Période de sénescence.

Il est difficile de préciser la longévité des filaments seuls. La transplantation de filaments âgés de plus de 7 mois, provenant de souches stériles, portant uniquement des gemmes, permet encore de reproduire des souches nouvelles.

Pendant cette période de sénescence les échecs rencontrés à l'ensemencement sont de plus en plus nombreux (tableau II).

La période de sénescence est très prolongée, l'activité réductrice devient nulle, c'est une période différente de la période de vie ralentie.

2° *La période d'induction de la sexualité.*

Je suis donc amené à diviser la vie de l'*Achlya flagellata* en périodes, dans lesquelles la sexualité occupe une position différente de celle qu'elle occupe dans la vie d'autres Champignons.

Pour L. E. HAWKER et P. M. HEPDEN (1962), la sexualité apparaît comme la conséquence d'une intense respiration. Ces auteurs distinguent cependant une période préparatoire, mais ils n'insistent pas sur son importance. G. TURIAN (1969) insiste beaucoup sur l'importance de l'oxygène.

Ici, chez l'*Achlya flagellata*, les résultats expérimentaux sont nets. L'induction de la sexualité se manifeste par la différenciation des premières anthéridies, entre le 8^e et le 15^e jour, c'est-à-dire à un moment où tous les milieux P E Hy PH ont la même concentration en oxygène (fig. 13). Ce n'est donc pas la concentration en oxygène qui est la cause des différences observées dans la reproduction.

C. — INFLUENCE DU pH SUR LE DÉTERMINISME ET LES MODALITÉS DE LA REPRODUCTION D'UNE SAPROLÉGNÉE

I. — INFLUENCE DU pH SUR LA CROISSANCE VÉGÉTATIVE

L'étude de la croissance végétative n'est pas le but de ce travail. C'est afin d'avoir une idée approximative de cette question que des mesures de longueur ont été effectuées. Il n'est pas possible de mesurer le poids sec des souches avec des cultures sur bois. La croissance végétative a d'ailleurs été étudiée par de nombreux auteurs (M. VOLKONSKY, 1933; A. L. SCHADE, 1940; K. S. BHARGAVA, 1946; H. S. REISCHER, 1951; A. W. BARKSDALE, 1962; C. B. DAVEY et G. C. PAPAVIZAS, 1962).

Il ne semble pas utile de refaire exactement le même travail. J'ai réalisé quelques séries de mesures de poids sec dans les milieux synthétiques gélosés particuliers. Elles seront probablement publiées dans un autre article. J'ai retrouvé sensiblement les mêmes résultats que ceux obtenus par les différents auteurs pour des valeurs de pH qui permettent une bonne croissance, c'est-à-dire de pH 4,5 à pH 7.

La recherche des valeurs du pH qui correspondent aux conditions limites de la croissance végétative pose un problème beaucoup plus délicat qui n'a pratiquement pas été étudié en détail.

1° La limite acide de la croissance.

La valeur de pH 4,5 est à la limite acide des tampons phosphates. Il est donc intéressant d'utiliser les tampons BRITTON et ROBINSON qui ont une plus grande étendue, leur échelle allant de 1,8 à 11,9. L'expérience montre que, avec ces tampons comme avec les tampons phosphates, la limite de la croissance est voisine de pH 4,5. Pour pH 4,5, la croissance est importante. Pour pH 4,4 la croissance est très faible et pour pH 4,3 elle est nulle.

Il faut examiner la souche au microscope pour s'apercevoir que, sur les gros filaments de l'ensemencement à pH 4,4, des filaments fins peu nombreux se développent. Il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu, dans des souches vieilles de 10 jours.

Pour pH 4,3 le cytoplasme est immobile et semble coagulé; mais les sommets des filaments ne sont pas désorganisés. Après un séjour de 8 jours à ce pH, les filaments de l'ensemencement, transplantés dans un autre milieu de pH favorable, sont l'objet d'une croissance normale. Un autre problème se poserait donc : préciser le pH à partir duquel le mycélium se désorganise et dans quel délai.

La réponse à cette question est très relative. Le temps d'immersion dans un milieu trop acide intervient d'une part, mais la composition chimique du milieu intervient également. Par exemple, dans des milieux de type P E Cys PH contenant une concentration $2 \cdot 10^{-6}$ g/l de cystéine, la limite se situe aux alentours de pH 6,4. Donc la recherche des limites de la croissance en fonction du pH n'a pas tout l'intérêt prévisible, a priori, avant que l'étude expérimentale soit entreprise.

2° La limite basique de la croissance.

Pour les pH basiques, le problème est encore plus délicat. A partir de pH 7,5, la croissance commence avec un retard qui atteint souvent 15 jours. Un examen microscopique du mycélium d'un ensemencement datant de 7 jours ou 15 jours montre des courants cytoplasmiques, mais pratiquement pas de croissance (fig. 17).

Ensuite la croissance est plus lente que dans les milieux acides. Si les mesures sont réalisées après 1 mois de culture, la longueur des filaments est comparable à celle des milieux acides, mais la densité des filaments est moins grande. Cet état de choses se maintient pour des

milieux de pH initiaux 7,5 et 7,9 en présence de tampons phosphates, et jusqu'à pH 8,4 en présence de tampons BRITTON et ROBINSON.

Pour l'*Achlya flagellata* souche R, les pH limites de la croissance végétative sont donc pH 4,5 et pH 8,4 (dans les milieux P E PH Bri).

3° Causes du retard de la croissance en milieux basiques.

Dans certaines séries de cultures, la croissance n'a pas été visible avant 1 mois de culture, ce qui peut laisser penser que le mycélium a besoin d'un certain temps pour s'adapter, car tous les ensemencements sont réalisés à partir de souches-mères vivant dans les milieux acides.

Il y a probablement un mécanisme voisin de celui que l'on connaît chez les Bactéries sous le nom de phase de latence (A. LWOFF et P. SCHAEFFER, 1966). Le Champignon modifie peut-être son arsenal enzymatique en fonction du milieu, car les substances présentes au départ ne sont pas dans le même état, en particulier les acides aminés, les quinones, etc., suivant que le milieu est acide ou basique (E. W. SIMONS, 1950; W. ARMSTRONG et A. ROTHSTEIN, 1964).

Au cours d'études sur les colorations vitales, A. GUILLIERMOND et G. GAUTHERET (1940, 1946) ont montré la complexité des phénomènes qui se déroulent dans les Champignons avant que la croissance reprenne. Il y a absorption, réduction, puis excrétion du colorant durant une période qui est d'autant plus longue et qui conduit d'autant moins à une croissance que le pH est plus basique. Ces auteurs ont montré que les Saprolegniées présentent un comportement original, différent de celui des Levures et d'autres Champignons, mais il existe toujours un temps de latence avant que la croissance commence.

Mes observations confirment les travaux de GUILLIERMOND et GAUTHERET. Mais ces auteurs ont surtout étudié ce qui se passe pendant les deux premières semaines du développement végétatif, alors que le présent travail porte essentiellement sur la reproduction qui se développe après 15 jours de culture. Les interactions organisme-milieu sont loin d'être achevées : elles se prolongent pendant au moins 6 mois.

4° La croissance en milieux perfusés.

Des cultures dans des erlenmeyers de 5 000 ml contenant 2 000 ml d'eau distillée et un rameau de Pommier de taille standard permettent d'obtenir des filaments mycéliens longs de 25 cm.

Dans des cultures en perfusion, en faisant s'écouler une solution de cystéine 10^{-2} M dans des flacons de 2 000 ml munis d'une tubulure d'écoulement, tout le récipient est finalement envahi par le mycélium. Donc l'élimination de substances de déchets par perfusion de solution nutritive pourrait assurer une croissance végétative infinie.

II. — INFLUENCE DU pH SUR LA MULTIPLICATION ASEXUÉE

Contrairement à ce qui serait prévisible, cette question précise n'a pas fait l'objet d'études approfondies, alors que la bibliographie sur les zoospores et leur structure est abondante.

Citons cependant D. W. GRAY (1939), S. B. SALVIN (1942), K. S. BHARGAVA (1950), B. T. LINGAPPA (1955).

Il se trouve que dans les cultures sur bois, réalisées à des pH différents, de grandes variations sont apparues dans les modalités de la reproduction. Les résultats de ces expériences sont à la fois quantitatifs et qualitatifs.

1° *La méthode de mesure.*

Pour dénombrer les zoosporanges formés dans un milieu donné, un examen minutieux est nécessaire, car la répartition des zoosporanges et des gamétanges n'est pas homogène. Les anciens auteurs ont cherché à préciser un ordre d'apparition. Ce problème s'est également présenté à S. B. SALVIN (1942). En fait, cela dépend des conditions physico-chimiques réalisées dans le milieu.

Il faut faire de nombreuses numérations pour réduire les causes d'erreurs.

Chaque souche étudiée est l'objet de 5 à 8 prélèvements. Ces prélèvements effectués en des endroits différents de la souche ont, dans la mesure du possible, sensiblement le même volume.

Chaque prélèvement placé entre lame et lamelle est ensuite examiné sous 100 champs microscopiques. Lorsque les nombres de champs restent compris entre 60 et 100, les résultats sont ensuite ramenés à 100. Afin d'éviter les observations répétées d'un même champ microscopique, la préparation est déplacée d'une façon systématique en utilisant les graduations de la surplatine comme repères. Quelques préparations observées parallèlement sur des plaques de MALASSEZ ont conduit à des résultats superposables.

Dans chaque champ, un dénombrement des différents états des zoosporanges et des gamétanges est réalisé, bien que ce soit un travail fastidieux.

Pour chaque type de sporocyste ou d'oogone, le total est effectué d'abord pour chaque prélèvement, en ramenant à 100 champs lorsque cela est nécessaire. Puis la moyenne entre ces prélèvements est faite; je l'appelle indice de sporocystes ou d'oogones.

Chaque indice caractérisant une souche correspond au nombre moyen d'organes du type envisagé rencontré dans 100 champs pris au hasard. Mais cet indice est obtenu après avoir examiné, en fait, de 500 à 800 champs microscopiques.

Ces nombres sont obtenus en procédant toujours de la même manière,

ils permettent donc d'établir des comparaisons et des graphiques. Ils n'ont pas une valeur absolue, mais une valeur relative. Dans quelques cas exceptionnels, le nombre étant très grand, j'ai renoncé à un dénombrement exact, et, dans ces cas, j'ai indiqué qu'il s'agissait d'un nombre approximatif. En pratique, dans les cultures sur bois la numération est toujours possible.

2° Résultats quantitatifs d'ensemble.

Le nombre total de sporocystes varie beaucoup suivant le pH du milieu. Les figures 15 et 16 représentent les moyennes obtenues à partir de 10 séries de cultures sur bois âgées de 1 mois à 3 mois. Ils montrent

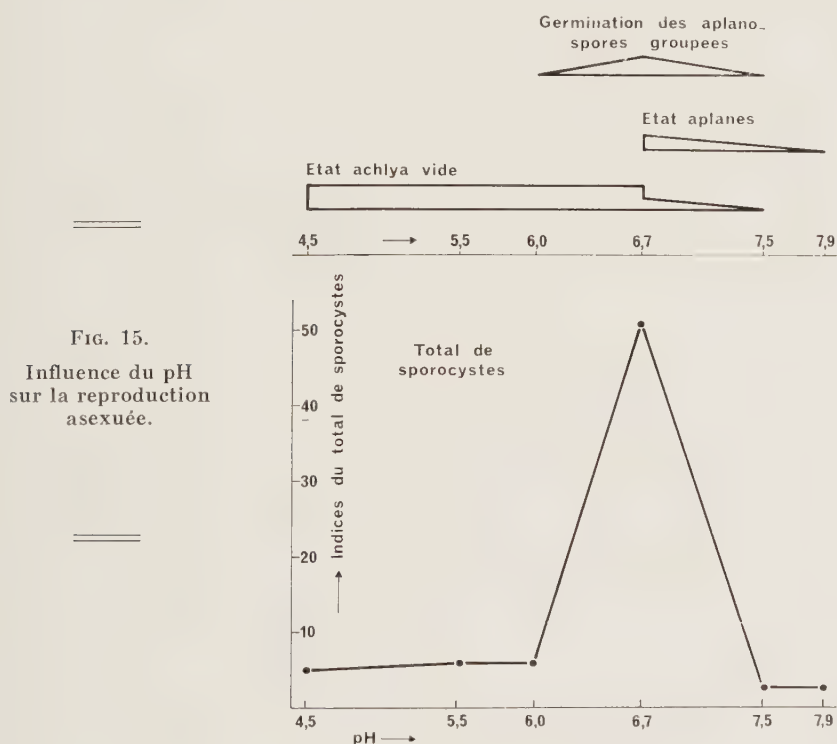


FIG. 15.
Influence du pH
sur la reproduction
asexuée.

que les milieux de pH 6,7 contiennent les souches où la reproduction est intense. Il est probable que ce pH favorise des mécanismes enzymatiques. Il faudrait savoir dans quelle mesure le pH du milieu influe sur le pH cytoplasmique du Champignon, mais quel que soit le mécanisme, les expériences permettent d'affirmer que le pH du milieu influe sur la reproduction.

Le pH intervient sur la croissance. La comparaison des courbes de croissance et des courbes de reproduction (fig. 15 et 17) montre que

pour pH 4,5 - 5,5 - 6,0, la croissance est sensiblement égale à celle de pH 6,7 alors que la reproduction est très différente. Les deux phénomènes sont donc indépendants. La méthode de numération est d'ailleurs indépendante de la croissance. C'est seulement pour les milieux basiques, pour pH 7,5 et pH 7,9, que les mécanismes semblent liés : la croissance et la reproduction asexuée sont également faibles.

La figure 20 montre que la formation d'appareils reproducteurs se prolonge pendant 3 mois, alors que la croissance cesse avant la fin du premier mois.

3° Résultats qualitatifs et quantitatifs détaillés.

On sait que les mots *Achlya*, *Dictyuchus*, *Aplanes*, *Thraustotheca* servent à la fois à désigner des types de sporocystes et à définir des genres (W. C. COKER et V. D. MATTHEWS, 1937; T. W. JOHNSON Jr., 1956; F. K. SPARROW Jr., 1960).

La systématique serait simple si un même Champignon n'était pas capable de produire des sporocystes de différents types. Cette question est connue depuis longtemps (DE BARY, 1881; W. C. COKER, 1923), mais elle est restée sans solution. Les discussions concernant l'*Achlya treleaseana* le prouvent (T. W. JOHNSON Jr., 1956). Par ailleurs, certains Champignons, tels que le *Protoachlya paradoxa* (Coker) ou l'*Isoachlya toruloides* (Kauffman et Coker), ont pu constituer des genres où l'association de deux types de sporocystes a été un caractère retenu par le systématicien (W. C. COKER, 1923).

Il ne faut pas perdre de vue que presque toutes les espèces ont été définies sans tenir compte des conditions physico-chimiques des milieux de culture et que ces milieux étaient contaminés par des bactéries. Seuls les travaux postérieurs à 1925 (M. J. CHAZE, 1925) ont pu être réalisés dans des conditions aseptiques. Or, à cette date la plupart des espèces étaient décrites.

J'ai déjà (J. BARBIER, 1950) montré la faiblesse des caractères morphologiques utilisés sans tenir compte des conditions physico-chimiques des milieux de culture. Chez deux Phycomycètes aquatiques, une espèce à spores biflagellées, l'*Apodachlya brachynema* (Hildebrand), et une espèce à spores uniflagellées le *Gonapodya prolifera* (Cornu), j'ai en particulier observé des germinations de spores dans les sporocystes comme chez les *Aplanes*.

Il est possible que les différentes émissions de spores soient sous la dépendance de caractères génétiques particuliers, et qu'il y ait parfois des pertes de fonctions (A. LWOFF, 1944). De toute façon le présent travail démontre que le pH du milieu influe sur le Champignon et que ce facteur externe est responsable de l'apparition de sporocystes sous trois états différents et dans des proportions variables.

Une systématique fondée sur des caractères qui varient sous l'influence des milieux de culture n'a donc pas des bases solides.

S. B. SALVIN (1942) a étudié cette question et il conclut par l'influence des substances de déchets.

La figure 15 représente le nombre total de sporocystes obtenu pour 100 champs microscopiques. C'est l'indice du total des sporocystes.

La figure 16 a été établie en calculant le pourcentage des différents types de sporocystes par rapport à cet indice.

a) Sporocystes de type *dictyuchus*.

Les sporocystes libérant des zoospores suivant le mode *dictyuchus* sont très peu nombreux dans les cultures pures dont le milieu est confiné. Leur nombre moyen pour 100 champs est inférieur à 1. Ils se forment dans les milieux de pH 4,5 au début de la culture, mais cela ne provient pas d'un ordre d'apparition obligatoire (S. B. SALVIN, 1942), car il n'y a pas de sporocystes de type *dictyuchus* dans les milieux moins acides.

Les résultats obtenus dans les milieux P E Hy PH expliquent les constatations de A. APINIS (1930). Dans des milieux acidifiés probablement pour lutter contre les Bactéries, des sporocystes de type *dictyuchus* se forment fréquemment; d'où des changements de désignation, par exemple pour le *Dictyuchus polysporus* Lindstedt.

Lorsque des cultures sur bois en eau distillée (de type P E), vieilles de 3 jours, sont perfusées par de l'eau distillée pendant 8 jours, le pH est pratiquement maintenu à pH 4,6 pendant toute l'expérience. L'examen microscopique montre de nombreux sporocystes. Il y a accélération de la multiplication asexuée, car dans les cultures confinées de même âge les sporocystes sont rares. En outre, la proportion de sporocystes de type *dictyuchus* atteint 15 %. Le nombre des sporocystes pleins est très réduit (2 %). Presque tous les sporocystes sont vides.

La même expérience réalisée avec des cultures vieilles de 1 mois conduit à des résultats semblables. L'eau distillée qui s'écoule dans le milieu élimine les déchets du métabolisme et le milieu confiné qui avait pour pH 5,1, revient au pH 4,5. Dans ces conditions tous les sporocystes se vident suivant le mode *achlya* ou le mode *dictyuchus*. Il y a en outre, pendant la perfusion, formation basipète de sporocystes. Toute la zone active de l'extrémité de nombreux filaments se transforme ainsi en 2 ou 3 sporocystes qui libèrent immédiatement leurs spores, et toutes les spores passent au stade flagellé. Ceci rejoint la méthode ancienne (M. CORNU, 1877) et toujours employée du « test de l'eau distillée » (G. TURIAN, 1955).

Les mêmes résultats sont obtenus en réalisant des perfusions avec de l'eau distillée contenant de la cystéine à 1 g par litre. Ce n'est pas tellement la pureté de l'eau qui est responsable de cette intense multiplication asexuée, mais à la fois l'élimination des substances de déchets et l'acidité du liquide de perfusion.

Dans des perfusions réalisées avec des tampons phosphates à demi-dilution, les sporocystes de type *dictyuchus* ne se forment que dans les perfusions de pH 4,5. Ils sont peu nombreux. Il semble que les tam-

pons phosphates ne favorisent pas leur apparition. Il n'y a pratiquement pas d'accélération dans la formation et la libération des zoospores dans le cas de perfusions basiques.

Cette question n'est pas simple. Dans les cultures réalisées en présence de Bactéries, peu de temps après la récolte de la souche mère, les sporocystes de type *dictyuchus* se formaient très souvent. Dans ces conditions le milieu était très chargé en substances de déchets. L'action des Bactéries est trop complexe pour qu'il soit possible d'analyser cette question.

b) Sporocystes pleins.

Dans les cultures aseptiques en milieux confinés, les sporocystes qui ne libèrent pas leurs spores sont toujours nombreux. La figure 16 montre nettement que le nombre de sporocystes vides diminue rapidement lorsque le pH s'élève. Il est net que seuls les milieux acides favorisent la formation et la libération des spores flagellées.

Dans les sporocystes pleins il faut distinguer deux cas.

Généralement, les spores sont bien délimitées et seul le problème de leur libération se pose. Mais il y a également des sporocystes où la fragmentation du cytoplasme est plus ou moins achevée. Il peut s'agir de sporocystes dans lesquels la genèse des spores est stoppée.

Pour pH 4,5 le nombre élevé des sporocystes vides montre que la genèse des spores se fait bien.

Au contraire, il semble que dans les milieux basiques la formation des spores s'achève difficilement. C'est la genèse des spores qui se trouve perturbée à partir de pH 7,5. Le problème de l'émission des zoospores ne se pose guère : entre pH 7,5 et pH 7,9, même la libération d'aplanospores cesse. Pour pH 7,9 un sporocyste formé a seulement une chance sur cent d'émettre des spores (fig. 16).

Les perfusions réalisées dans des conditions basiques augmentent le nombre de zoospores libérées, mais le nombre global de sporocystes n'est guère modifié.

c) Sporocystes de type achlya.

La libération des zoospores se réalise généralement sous la forme *achlya* dans les cultures en milieux confinés. Les aplanospores sont parfois désignées sous le nom de kystes, leur masse ne reste que rarement fixée à la bouche du sporocyste. Généralement, ces aplanospores libèrent des zoospores sans que leur masse se dissocie.

Je n'ai jamais observé de zoospores du premier type avec la souche d'*Achlya flagellata* utilisée. Il est probable que ce n'est pas une plus forte acidité du milieu qui provoquerait l'émission de zoospores du premier type, car pour pH 4,5 on assiste à une accélération dans la vitesse de libération des zoospores de deuxième génération. Cette libération se réalise pratiquement dans le sporocyste.

L'état *achlya*, libérant des aplanospores qui libèrent ensuite des zoospores de deuxième génération, apparaît comme un état intermédiaire

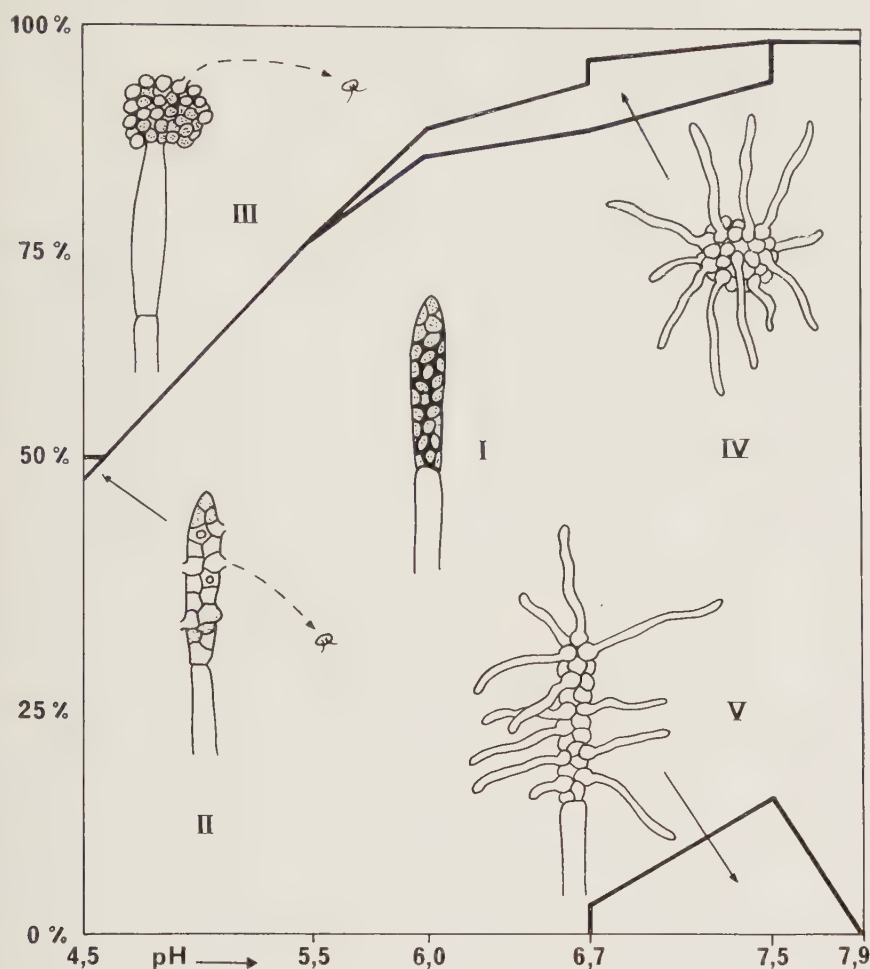


FIG. 16. — Pourcentage des différents états des sporocystes par rapport au nombre total des sporocystes.

I. Sporocyste indifférencié : état *achlya* non achevé, susceptible d'évoluer.

II. Etat *dictyuchus* (à pH 4,5).

III. Etat *achlya* typique, avec libération des zoospores.

IV. Etat *achlya*, mais sans stade flagellé, germination des aplanospores groupées.

V. Etat *aplanes* (en pH neutre ou basique).

entre l'état *dictyuchus* où il y a pratiquement suppression des aplanospores et l'état *aplanes* où il y a suppression des zoospores de deuxième génération.

d) Sporocystes libérant des aplanospores à germination directe.

Entre pH 6,0 et pH 7,5 une faible proportion de sporocystes libère des aplanospores qui restent groupées comme lors d'une émission normale de type *achlya*. Mais ces aplanospores ne libèrent pas de zoospores,

elles germent directement. Ceci montre la fragilité de la distinction entre aplanospores et zoospores enkystées.

Les fins filaments de germination (diamètre $3\ \mu$) se développent de façon rayonnante autour de la masse compacte des aplanospores qui ne se séparent pas et ne restent presque jamais adhérentes à l'ouverture du sporocyste. Puis les filaments grossissent et se ramifient, donnant une petite souche sphérique alors visible à l'œil nu.

Dans la nature, ces souches entraînées par les courants de l'eau peuvent constituer un mode de dissémination efficace. Elles s'accrochent très facilement aux branches immergées.

La résistance de ces jeunes souches est certainement beaucoup plus prolongée que celle des zoospores dont l'existence est limitée à quelques heures (J. BARBIER, 1950).

Ce mode de multiplication asexuée est une simple variante de la reproduction de type *achlya*. Dans des conditions de vie défavorables il est possible qu'il offre un avantage non négligeable.

e) Sporocystes de type *aplanes*.

Entre pH 6,7 et pH 7,9, la germination des aplanospores peut se réaliser dans les sporocystes comme chez les *Aplanes*.

Entre pH 6,7 et pH 7,5 la tendance à la germination suivant le mode *aplanes* s'accroît et atteint 15 % des sporocystes pour pH 7,5. Tout se passe comme si les aplanospores germaient avant leur émission.

Il ne s'agit pas d'un phénomène d'accélération de la germination. Dans ces milieux neutres ou basiques, le Champignon a une croissance ralentie; les conditions de vie ne sont guère favorables.

Le nombre total de sporocystes est faible et des observations réalisées dans des cultures de 15 jours, 1 mois, 2 mois, montrent que le nombre des sporocystes de type *aplanes* augmente tardivement.

Pour pH 4,5, la tendance à émettre des zoospores suivant le mode *dictyuchus* correspond à une accélération dans la libération des zoospores, elle est précoce. Ici on assiste à un phénomène opposé : la tendance à la non-émission des spores conduit finalement à la germination plus ou moins tardive des spores à l'intérieur des sporocystes.

Entre pH 7,5 et pH 7,9 le nombre de sporocystes vides est de 1 %. Il n'y a pratiquement plus d'émission ou de germination de spores pour un pH 7,9.

f) Sporocystes de type *thraustotheca*.

Dans de très vieilles cultures âgées de plus de 1 an quelques sporocystes pleins libèrent leurs aplanospores par une lyse de la membrane, indépendamment de l'influence du pH. J'ai observé ce mode d'émission de type *thraustotheca* très rarement. S. B. SALVIN (1942) l'a provoqué chez l'*Achlya flagellata* avec des substances de déchets provenant d'autres souches mycéliennes.

4° *Remarques critiques sur la taxonomie.*

Ces observations, s'ajoutant à celles des autres auteurs, font nettement apparaître la fragilité de la définition des genres chez les Sapro-légniées. Les conditions de culture influent sur les critères utilisés par les taxonomistes.

L'*Achlya treleaseana* (Humphrey), décrit en 1906 par KAUFFMAN, a été dénommé *Saprolegnia treleaseana* par HUMPHREY en 1893, puis *Aplanes treleaseanus* par COKER en 1927.

Le *Protoachlya paradoxa* (Coker), décrit en 1923 par COKER, a d'abord été défini *Achlya paradoxa* par COKER en 1914, puis *Isoachlya paradoxa* par KAUFFMAN en 1921.

Le *Protoachlya polyspora*, décrit en 1930 par APINIS, a été dénommé *Dictyuchus Polysporus* par LINDSTEDT en 1872.

Il faudrait redéfinir les espèces dans des conditions de culture rigoureuses, en les faisant se développer par exemple à différents pH pour les obliger à exprimer toutes leurs possibilités génétiques. Les critères morphologiques sont sous la dépendance de la physiologie (F. et M^{me} MOREAU, 1939) mais en outre les hybridations sont possibles (A. W. BARKSDALE, 1960).

J. M. JOHNSON Jr. (1956) et F. K. SPARROW Jr. (1960) proposent la disparition du genre *Aplanes*. Mes observations fournissent un argument supplémentaire pour cette suppression du genre *Aplanes*, mais également du genre *Thraustotheca* et peut-être du genre *Dictyuchus* (J. M. JOHNSON Jr., 1951).

Le genre *Dictyuchus* défini par l'existence d'une seule oosphère par oogone pourrait subsister. Dans ce cas les sporocystes de type *dictyuchus* ne seraient qu'un caractère taxonomique secondaire. Mais où classer par exemple l'*Achlya glomerata* Coker qui produit des oogones à une seule oosphère et des sporocystes de type *achlya* et *aplanes* ?

III. — INFLUENCE DU pH SUR LA REPRODUCTION SEXUÉE

L'influence du pH sur la reproduction sexuée a été quelquefois étudiée, sans conduire à des résultats nets, en particulier dans les milieux gélosés (G. C. PAPAIVIZAS et C. B. DAVEY, 1960). J. R. RAPER, en 1939, constate que la croissance et la formation des organes sexuels ne varie guère de pH 3,7 à pH 7,5. Mais en 1942, en reprenant ses expériences dans d'autres conditions, J. R. RAPER montre que l'induction de la réaction sexuelle mâle passe par un maximum pour pH 6 environ. Mes expériences confirment ces observations en faisant apparaître plus nettement l'influence du pH.

a) *Variations et dénombrement.*

Les variations possibles de la reproduction sexuée ne sont pas très nombreuses. La présence ou l'absence d'anthéridies est un caractère utilisé en systématique, mais avec des nuances qui montrent qu'il s'agit d'un caractère fluctuant. Par exemple, chez l'*Achlya recurva* Cornu il y a 25 % d'oogones parthénogénétiques et 75 % d'oogones fécondés par des anthéridies (W. C. COKER et V. D. MATTHEWS, 1937).

J'ai renoncé à dénombrer les oogones fécondés par des filaments anthéridiaux, car il n'est pas toujours prouvé, lorsqu'un filament anthéridial s'accrole sur la paroi d'un oogone, que la fécondation a lieu. La parthénogenèse est assez fréquente, et même lorsqu'il y a des filaments anthéridiaux, ceux-ci ne s'accrochent pas toujours sur les oogones. Il faudrait à chaque fois faire une étude cytologique (F. et M^{me} MOREAU, 1935).

Dans les statistiques présentées dans la figure 18, les nombres donnés pour les gamétocystes femelles stériles correspondent à l'ensemble des ébauches oogoniales vides pourvues ou dépourvues de cloisons basales et des gamétocystes contenant des oosphères inachevées.

Si l'on suppose l'existence d'une action initiale équivalente aux hormones des groupes A et B de J. R. RAPER (1939), les autres hormones du groupe D n'auraient pas joué leur rôle dans cet ensemble de gamétocystes stériles. Notons que l'existence du groupe d'hormones C est incertaine (A. W. BARKSDALE, 1960-1963) et que la fécondation chez l'*Achlya flagellata* souche R est souvent dicline, bien que ce soit une espèce homothallique (J. R. RAPER, 1950).

Enfin, il arrive que des chaînes d'oogones vides se constituent sans cloisonnement basal, montrant bien que la formation des ampoules oogoniales peut se réaliser sans qu'il y ait ébauche d'oosphères. Tout se passe comme s'il y avait une surabondance des hormones des groupes A et B (car les anthéridies se développent sans assurer de fécondation) et une déficience en hormones du groupe D assurant la formation de la cloison basale oogonale et la différenciation des oosphères.

Quelquefois la dernière ampoule oogonale se délimite par une cloison basale et voit se former des oosphères parthénogénétiques. Les nombres donnés pour les chaînes d'oogones groupent les chaînes stériles, les chaînes contenant rarement des oosphères, sans tenir compte du nombre d'ampoules oogoniales.

b) *Résultats qualitatifs et quantitatifs.*

La figure 17 est établie avec la moyenne des indices des gamétocystes femelles fertiles de 10 séries de cultures dans des milieux P E Hy PH.

La figure 18 représente le pourcentage des trois aspects des gamétocystes femelles par rapport à leur nombre total. Ces valeurs sont éga-

FIG. 17.
Influence du pH et du potentiel d'oxydo-réduction sur la fertilité sexuelle, comparaison avec la croissance végétative.

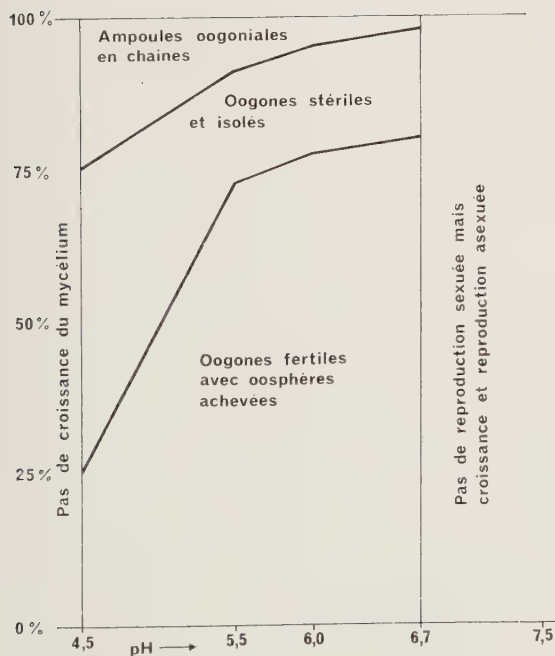
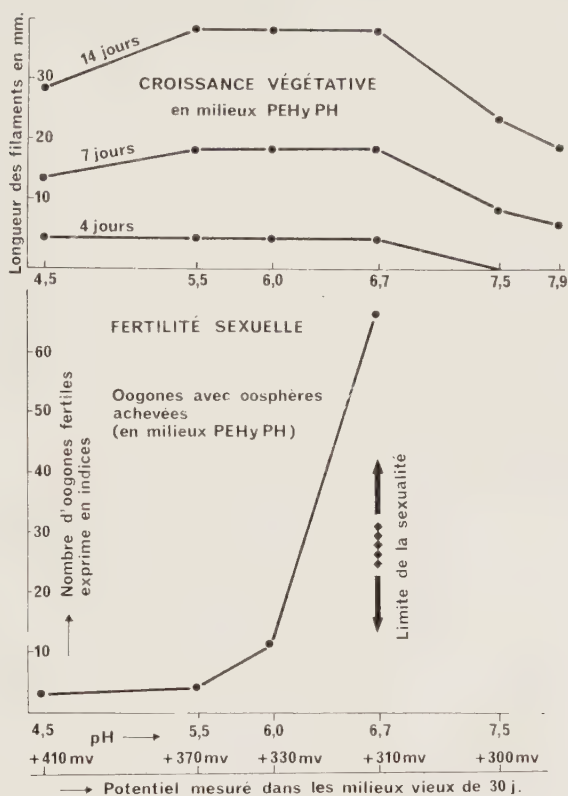


FIG. 18.
Pourcentage des différents types d'oogones par rapport au nombre total d'oogones.

lement établies à partir de la moyenne des indices des 10 séries de cultures P E Hy PH.

Ces deux graphiques montrent que pour pH 4,5, d'une part le nombre total d'oogones n'est pas très élevé, d'autre part les gamétocystes femelles restent souvent stériles ou forment des chaînes généralement stériles.

L'examen microscopique montre que les anthéridies sont aussi fréquentes au contact des oogones que pour pH 5,5, 6,0 ou 6,7. Donc l'activité sexuelle, même si elle n'est pas très grande, conduit à des fécondations. La parthénogenèse n'est pas plus fréquente que pour les autres pH.

Dans l'hypothèse où les mécanismes, chez les espèces hétérothalliques et chez les espèces homothalliques, sont les mêmes, tout se passe comme si, à pH 4,5, les hormones A et B de J. R. RAPER étaient actives, tandis que les hormones D étaient peu abondantes, laissant souvent la sexualité à un stade inachevé.

Entre pH 4,5 et pH 5,5, la proportion d'oogones fertiles augmente beaucoup alors que le nombre total d'oogones augmente peu, comme si les hormones D prenaient une activité normalement proportionnée.

Entre pH 5,5 et pH 6,7, la proportion des oogones fertiles et des oogones inachevées ne varie plus beaucoup; donc les conditions sont requises pour que toutes les hormones sexuelles agissent.

On assiste, entre pH 6,0 et pH 6,7, à une augmentation importante de la reproduction sexuée. Pour une variation de 0,7 unité de pH le nombre d'oogones fertiles est multiplié par 6.

Puis, pour pH 7,5 et pH 7,9, il y a suppression totale de la sexualité. Cette constatation a pu être faite dans 10 séries d'expériences semblables.

Dans trois séries d'expériences j'ai réalisé des pH 7,0 et 7,2 sans trouver d'éléments contradictoires à ce résultat que j'ai enregistré avec surprise.

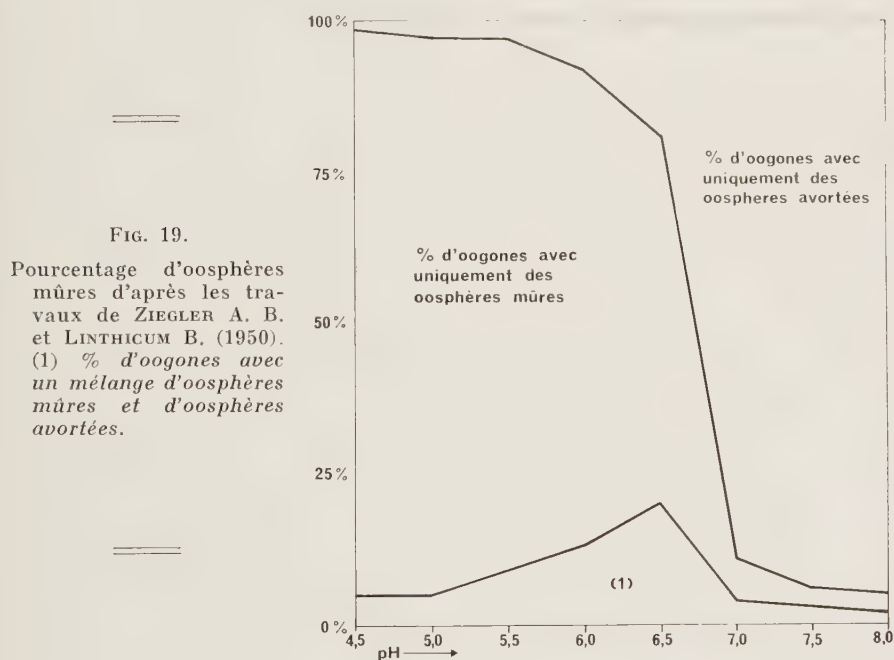
Cette valeur de pH 6,7 correspond à l'optimum de la reproduction asexuée. Les pH supérieurs et inférieurs déterminent des nuances dans les émissions de spores. Mais pour la reproduction sexuée le phénomène est différent : tout se passe comme s'il s'agissait d'une valeur limite pour les milieux de type P E Hy PH. Cette question est étudiée au chapitre D.

Le même type de courbes (fig. 21), représentant une augmentation importante de la sexualité entre pH 6,0 et 6,7, puis une absence de sexualité dans les milieux basiques, se rencontre dans les cultures de type P E Hy PH, P E Hy PHV et P E Thio PH. Il ne peut pas s'agir d'un accident (voir chap. D).

IV. — INFLUENCE DU pH
SUR LA GERMINATION DES ZYGOTES
ET POSITION DE LA MÉIOSE DANS LE CYCLE DE REPRODUCTION

1° Influence du pH sur la germination des zygotes.

a) Je n'ai pas fait d'étude statistique de cette question. Mais les travaux de A. W. ZIEGLER (1948), puis de A. W. ZIEGLER et B. LINTHICUM (1950) sont remarquables à ce sujet et ils fournissent des valeurs qui correspondent assez bien avec mes différents résultats.



Des zygotes placés dans des solutions de pH 4,9 et pH 5,9 germent mal. Pour pH 7,9 la germination ne se fait pas. Ces résultats sont valables pour de nombreuses espèces.

L'*Achlya tuberculata* Ziegler ou *lobata* (T. W. JOHNSON Jr., 1956), cultivé sur des grains de chènevis puis transporté dans des solutions de différents pH, forme des oogones dans les milieux de pH 7,0 à pH 8,0; mais ils contiennent des oosphères avortées dans la proportion de 89 % à 95 %. Alors que dans les milieux de pH 6,5 à pH 4,5 ce sont au contraire les oosphères arrivées à maturité qui sont dans la proportion de 61 % à 94 %. Les proportions sont donc renversées pour une valeur de pH située entre 6,5 et 7,0. C'est également pour pH 6,5 que

la proportion d'oogones contenant à la fois des oosphères avortées et des oosphères mûres atteint sa valeur maximale.

Les résultats de A. W. ZIEGLER et B. LINTHICUM (1950) sont reportés sur la figure 19, ils sont exprimés en pourcentage total d'oogones. La comparaison avec les figures 17 et 18 met en évidence l'importance des pH compris entre 6,5 et 7,0.

Il n'y a pas de dénombrement total d'oogones et le processus expérimental est différent du mien, le Champignon se développe d'abord sur les grains de chènevis avant d'être transporté dans des milieux tamponnés aux différents pH. Cependant, les idées générales sont sensiblement les mêmes. Les résultats obtenus avec l'*Achlya flagellata* souche R cultivée en milieu P E Hy PH sont plus nets : au lieu de 94 % d'oosphères avortées pour pH 7,5, j'obtiens une absence de reproduction sexuée à 100 %.

A. W. ZIEGLER et B. LINTHICUM (1950) ont réalisé deux types d'expériences, l'une mettant en évidence le rôle de la concentration en tannins et autres substances issues d'une décoction de feuilles de Chêne, l'autre mettant en évidence le rôle du pH indépendamment des tannins. Ils montrent que plus la concentration en extraits de feuilles de Chêne est grande, plus les zygotes mûrs sont nombreux. Il y a un seuil, avec 94 % d'oogones mûrs, pour une forte concentration en extraits de feuilles de Chêne donnant un pH 5,0, puis au-delà la croissance est stoppée.

Les auteurs n'expriment pas cette idée de seuil bien que leurs nombres conduisent à cette conclusion. C'est la concentration croissante en extraits de feuilles de Chêne qui commande la réaction du Champignon dans ce cas.

Je pense que mes résultats doivent leur netteté au fait que j'ai combiné les deux types d'action dans les milieux P E Hy PH, l'action du pH et l'action des quinones.

b) J'ai pu constater à plusieurs reprises la germination des oosphères de souches âgées de 3 mois issues de milieux P E Hy PH 6,7 placées soit en perfusion, soit dans l'eau distillée fraîche. Le réveil des zygotes se fait selon la description de A. W. ZIEGLER (1948), mais presque toujours un tube court traverse la paroi de l'oogone, l'oosphère libère son contenu vers l'extérieur, il n'y a pas croissance d'un filament avec formation d'un sporocyste terminal. L'*Achlya flagellata* souche R germe donc d'une façon particulière. Le stade pléthysmothallique (M. CHADEFAUD, 1960) de germination du zygote est raccourci au maximum. Il est pratiquement supprimé.

Ceci confirme les observations de J. N. COUCH, relatées par A. W. ZIEGLER (1948). Seuls l'*Achlya flagellata* et l'*Achlya Orion* ont des oosphères qui peuvent germer de cette manière. Chaque zygote se transforme en sporocyste de germination qui libère, selon J. N. COUCH, 8 à 10 zoospores.

Dans mes cultures j'ai pu constater que parfois le zygote se vide en

FIG. 20.

Nombre d'oogones et de sporocystes observés, suivant l'âge des souches. *Seul le total des sporocystes pour pH 6,7 et 5,5 est représenté.*

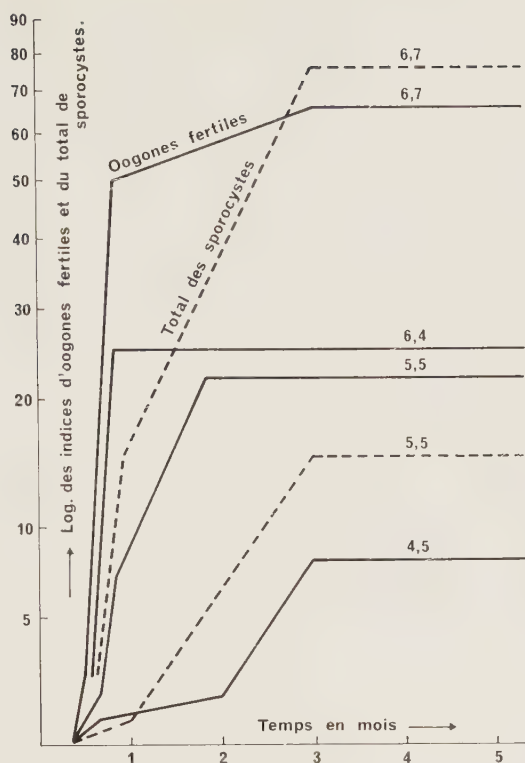
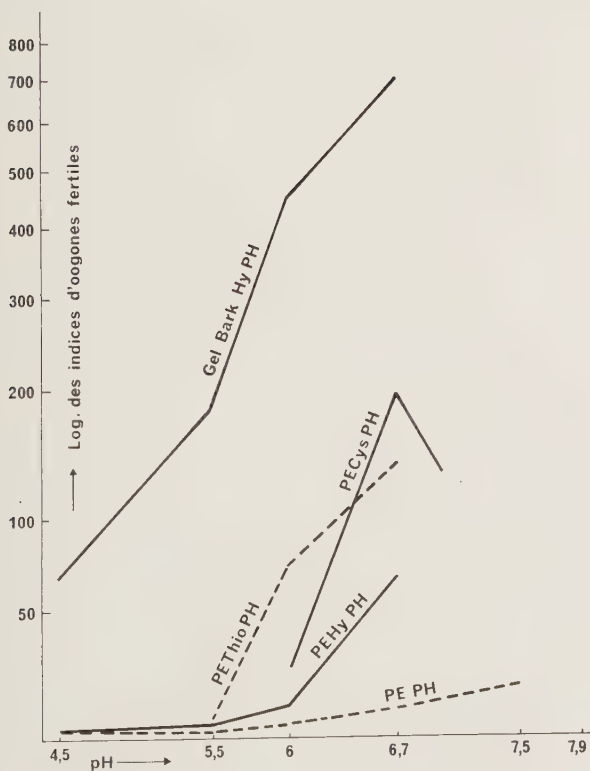


FIG. 21.

Fertilité sexuelle dans différents milieux.



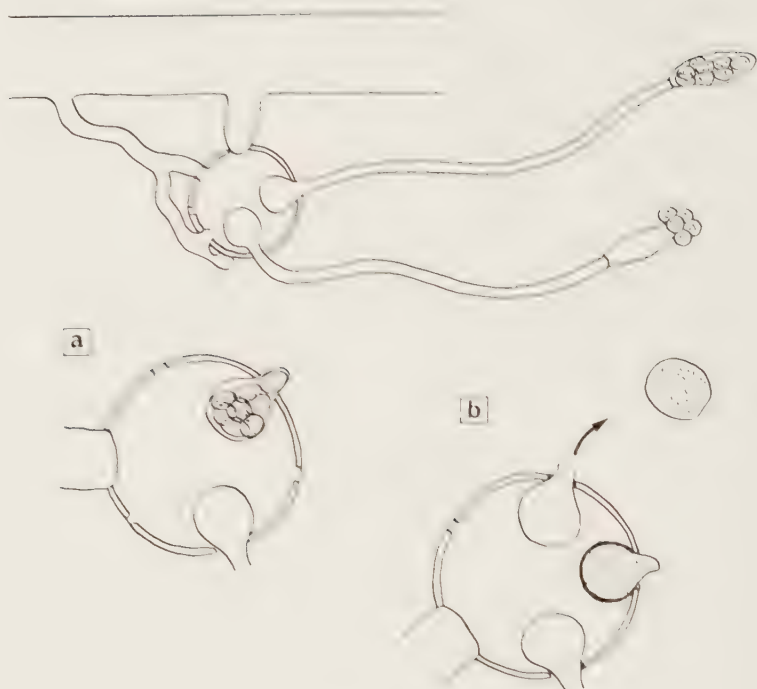


FIG. 22. — Germination des oosphères.

Cas général chez les Saprolegniées : dessin du haut.

Cas particuliers chez l'*Achlya flagellata* : dessins du bas (a) et (b).

libérant seulement une grosse masse sphérique par un tube court qui traverse la paroi de l'oogone au niveau d'une ponctuation. Chez le *Saprolegnia Thureti* de Bary, actuellement appelé *Saprolegnia ferax* (Gruith) Thuret, une germination de ce type peut se produire (A. de BARY et M. WORONIN, 1881). Une masse sphérique représentant le sporocyste de germination sort de l'enveloppe de l'œuf et de l'oogone par un tube court. DE BARY observe qu'elle donne naissance, dans un délai d'une heure, à 5 zoospores de germination.

2^e La position de la méiose.

a Il est classiquement admis que la méiose a lieu à la germination du zygote, mais les preuves sont faibles. A. W. ZIEGLER (1953) est un des seuls auteurs à avoir réalisé des observations dans ce sens. Cela tient aux difficultés rencontrées pour obtenir la germination des oosphères chez les Saprolegniées (J. H. BURNETT, 1968).

Récemment, E. R. SANSOME (1961-1963) a jeté un doute sur la position de la méiose vis-à-vis du zygote. Ses observations cytologiques le conduisent à affirmer que le thalle est diploïde : la méiose serait liée

à la gamétogenèse. La germination du zygote n'apporterait aucune modification nucléaire.

La position de la méiose n'est pas démontrée dans le cycle de nombreux Siphomycètes, même chez des espèces parasites très étudiées. C'est presque a priori que la méiose est placée après la fécondation. On connaît, chez les *Allomyces*, des thalles haploïdes et des thalles diploïdes; chez les Saprologniées le doute est permis.

b) M^{lle} Nguyen Thi Lau (1966), après avoir discuté les observations d'autres auteurs, conclut que la présence d'ions K^+ en proportion notable influe sur le déterminisme de la méiose (G. DEYSSON, 1965).

On sait l'importance de l'antagonisme des ions K^+ et Na^+ au point de vue de la perméabilité cellulaire (E. J. CONWAY, 1953, etc.). Il ne serait donc pas étonnant que ce facteur puisse jouer un rôle sur un Champignon placé dans des tampons phosphates SÖRENSEN où la proportion des ions Na^+ et des ions K^+ est très variable. La sexualité pourrait être déterminée non par le pH, mais par une certaine proportion d'ions K^+ et d'ions Na^+ réalisant les milieux de pH initial 6,7.

Il est probable que les observations de DEYSSON et M^{lle} NGUYEN THI LAU (voir G. DEYSSON, 1965) sont valables pour les Saprologniées. Il serait alors logique de penser que la méiose est liée à la gamétogenèse.

Or mes expériences réalisées avec des tampons véronal essentiellement riches en ions Na^+ montrent que les ions K^+ n'ont pas besoin d'être massivement présents pour que la gamétogenèse ait lieu. Les indices d'oogones dans les cultures P E Hy PHV sont très semblables aux indices d'oogones dans les milieux P E Hy PH. Si la méiose était liée à la gamétogenèse, il devrait y avoir une différence.

Ceci conduit à 3 conclusions :

- la formation des oogones et des anthéridies est indépendante de cet antagonisme des ions K^+ et Na^+ ;
- c'est la concentration en ions H^+ du milieu qui intervient;
- la méiose est probablement indépendante de la gamétogenèse, ou bien elle est insensible à cette question ionique.

Je suis amené, pour des raisons physiologiques, à penser que la méiose a lieu après la germination du zygote, ce qui confirme les idées généralement admises (S. L. OLIVE, 1965).

V. — LE pH ET L'ÉCOLOGIE

Le pH d'un étang est déterminé par de nombreux facteurs. Des facteurs sensiblement fixes tels que des facteurs édaphiques ou des facteurs dus à l'environnement permanent interviennent toujours.

D'autres facteurs sont très variables. Par exemple ceux qui sont liés à la photosynthèse. Ils conduisent à des variations journalières qui peuvent être inattendues, par exemple de pH 6,4 à pH 9,6 (P. VIVIER,

1952). L'absorption du CO_2 et la production d' O_2 par les plantes vertes entraîne de rapides modifications du biotope pour les Champignons. J'ai pu constater, au cours de récoltes dans la nature, que les eaux riches en Algues vertes ne sont pas favorables aux Phycomycètes.

Les variations journalières sont en général de l'ordre de pH 6,6 à pH 7,7, quant aux variations annuelles elles conduisent généralement sous nos climats à une valeur minimale en novembre (J. SMALL, 1946). C'est la période où j'ai fait les meilleures récoltes dans la région parisienne.

Dans les étangs de forêts le pH peut rester régulièrement tamponné à 6,2 sous l'effet des solutions humiques (P. VIVIER, 1952). Il est rare qu'il n'y ait pas des Phycomycètes dans les étangs forestiers aux eaux brunes.

L'Achlya flagellata souche R se développe de pH 4,5 à pH 8,4, ce qui lui permet d'avoir une croissance et une reproduction végétative dans de nombreux étangs aux eaux neutres ou moyennement acides. Il n'est donc pas très exigeant.

Par contre, la reproduction sexuée est très sensible au pH, au potentiel d'oxydo-réduction, et elle est liée à la présence d'oxygène.

Dans des cultures pauvres en oxygène la sexualité disparaît. Elle disparaît également dans des milieux assez riches en oxygène, contenant encore 60 % d'oxygène par rapport à la saturation, mais dont le potentiel d'oxydo-réduction descend en dessous d'un seuil de +310 mV à pH 6,8.

Pour cette valeur l'intensité de la reproduction sexuée est fortement augmentée.

Si l'on cherche à se représenter ce qui se produit sur une branche d'arbre tombant naturellement dans un étang, les étapes suivantes peuvent être prévues a priori si le pH du lac est voisin de 6,2 à 6,8.

Lorsque la branche flotte, elle est atteinte par les zoospores dont la mobilité est liée à la richesse en oxygène, à la pureté et à l'acidité de l'eau. La reproduction sexuée est possible mais faible.

Lorsque la branche s'enfonce et reste entre deux eaux, les souches donnent une abondante reproduction sexuée tant que la teneur en oxygène et le potentiel d'oxydo-réduction le permettent.

Lorsque la branche tombe au voisinage de la vase, à une certaine profondeur, le milieu risque d'être davantage réducteur et trop faiblement oxygéné. La reproduction sexuée est inhibée.

Lorsque le pH est plus basique que pH 6,8, la reproduction sexuée est nulle. C'est peut-être une des causes de l'absence de certaines Sapro-légniées dans certains étangs.

La multiplication végétative est toujours facile, ne serait-ce qu'à partir de gemmes. Peut-être que des espèces finissent par disparaître dans certains étangs lorsque la reproduction sexuée est constamment impossible.

Il ne faut pas généraliser trop vite. Les résultats obtenus par les différents auteurs prouvent que toutes les espèces n'ont pas exacte-

ment le même comportement (A. LUND, 1934; R. J. WHITNEY, 1942; P. E. PERROT, 1960; M. W. DICK, 1963; R. E. ROBERT, 1963; F. K. SPARROW Jr., 1968).

Dans ces conditions écologiques il faut se méfier d'une simple mesure de pH dans un milieu naturel au moment de la récolte, car le développement du Champignon s'est peut-être réalisé plusieurs semaines au préalable sous un autre pH. Il faut également se méfier des auteurs qui affirment que le Champignon est en anaérobiose alors qu'aucune mesure de tension d'oxygène n'est effectuée. L'exemple des lacs alpins, bien oxygénés à de grandes profondeurs, prouve qu'il faut être prudent. Toutes ces questions écologiques sont complexes.

D. — ÉTUDE DES CONDITIONS LIMITES DE pH ET DE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DÉTERMINANT LA SEXUALITÉ

I. — ANALYSE DES RÉSULTATS EN MILIEUX P E Hy PH

L'analyse des résultats concernant les variations de pH est plus facile à faire que l'analyse des résultats concernant l'évolution du potentiel (fig. 8, 9, 10). Le fait que le potentiel s'élève un peu, puis baisse beaucoup, puis remonte, permet difficilement de parler de valeur limite en présence d'oxygène, même si après 3 mois il se stabilise.

Dans les milieux P E Hy PH il est net que pH 6,8 constitue une valeur limite au-delà de laquelle la sexualité est bloquée (les milieux de pH 6,7 ne varient qu'entre pH 6,6 et pH 6,8).

Cependant, comme l'induction de la sexualité se fait très tôt, entre le 8° et le 15° jour, il suffit d'examiner les variations du potentiel pendant cette période (fig. 10). Il apparaît que les souches de pH 7,5 et 7,9 ont un potentiel en présence d'oxygène qui ne dépasse pas +360 mV pendant cette période. Seules les souches qui sont dans des milieux de potentiel plus élevé se reproduisent sexuellement. Cette constatation est importante.

Les mesures réalisées sous courant d'azote montrent que le potentiel d'oxydo-réduction des milieux P E Hy PH 4,5, 5,5 et 6 sont +410 mV, +370 mV et +330 mV. Toutes ces courbes ont la même forme que la courbe représentée pour P E Hy PH 6,7 (fig. 12). Dans les milieux P E Hy PH 6,7 la réaction sexuelle du Champignon atteint son maximum : le potentiel Red-Ox est de +310 mV. Pour les milieux de pH 7,5 et 7,9 il est de +300 mV et +295 mV : la sexualité est supprimée.

La cassure des droites (fig. 7) au voisinage de pH 6,0 est significative. Entre pH 5,5 et pH 6,0 pour une élévation de 0,5 unité pH, le potentiel

baisse de 40 mV, alors que, entre pH 6,7 et pH 7,9, pour une élévation de 1,2 unité pH il baisse seulement de 15 mV. Je pense que cela traduit une modification du métabolisme qui a une incidence sur la sexualité. Je ne pense pas que la correspondance des deux phénomènes soit due au hasard.

II. — ANALYSE DES RÉSULTATS AVEC D'AUTRES MILIEUX

La comparaison des résultats obtenus en employant d'autres milieux permet de préciser et de nuancer cette notion de conditions limites de la sexualité (tableaux IV et V).

a) Avec la thio-urée.

C'est une substance dont le potentiel Red-Ox est réversible comme celui de l'hydroquinone. Les mesures des milieux P E Thio PH donnent des valeurs qui se confondent avec celles des milieux P E Hy PH. Les résultats obtenus au point de vue des reproductions asexuées et sexuées confirment parfaitement les résultats obtenus avec l'hydroquinone (fig. 21).

b) Avec la réductose.

La reproduction asexuée n'est pas modifiée. Son maximum d'intensité se situe toujours aux alentours de pH 6,8 et la croissance végétative est très belle.

La figure 11 montre que le potentiel des milieux P E Ré PH baisse rapidement et descend un peu plus bas que le potentiel des milieux P E Hy PH. Puis il remonte et rejoint finalement, à 3 mois, celui des courbes P E Hy PH.

Pendant les 25 premiers jours, seuls les milieux de pH 4,5 et 5,5 ont des valeurs supérieures à +360 mV en présence d'oxygène. Il est remarquable que les seules souches fertiles se trouvent précisément dans ces milieux acides de pH 4,5 et 5,5, dont les potentiels, pendant la période d'induction de la sexualité, sont supérieurs à la limite +360 mV définie dans les séries P E Hy PH. C'est une confirmation du rôle joué par le potentiel indépendamment du rôle joué par le pH.

Notons cependant que la sexualité est faible (tableau IV), l'indice de la sexualité est inférieur à celui des milieux P E Hy PH 4,5 et 5,5. D'autre part, la réductose a peut-être un comportement voisin de celui de la réductone en présence de différents pH. La réductone est stable seulement lorsque le pH est inférieur à 6 (R. WURMSER et N. MAYER, 1935).

TABLEAU IV. — COMPARAISON DE CULTURES FERTILES VIEILLES DE 1 MOIS, mV = POTENTIEL MESURÉ À 1 MOIS, F INDICE DES OOGONES FERTILES

pH initial	4,5		5,5		6,0		6,7		7,5		7,9	
pH mesuré à 1 mois .	5,2		5,7		6,1		6,7		7,2		7,5	
	mV	F	mV	F	mV	F	mV	F	mV	F	mV	F
P E PH	445	1	415	1	400	5	380	10	360	18	350	0
P E Hy PH	410	2	370	3	330	8	310	50	300	0	295	0
P E Ré PH	375	1	350	1	330	0	290	0	290	0	280	0

c) Avec le bleu de méthylène.

En préparant des milieux P E Mé PH avec du bleu de méthylène à la concentration de 0,01 g par litre, j'ai obtenu des résultats voisins de ceux obtenus avec la réductose. C'est encore dans les pH acides, c'est-à-dire dans les milieux les moins réducteurs, que la sexualité peut se réaliser. Mais dans toutes ces expériences le nombre de gamétocystes anormaux est élevé et le nombre de gamétocystes fertiles contenant des oosphères achevées assez faible.

d) Avec la cystéine.

Cet acide aminé est très actif, il accélère la croissance et la reproduction (C. B. DAVEY et G. C. PAPAIVIZAS, 1962). Mais son emploi soulève des difficultés. La présence de cystéine acidifie le milieu et la chute de pH pour les milieux P E Cys PH après stérilisation est beaucoup plus grande que pour les milieux P E Hy PH. Les mesures de potentiel conduisent à des erreurs (R. WURMSER, 1930; L. F. HEWITT, 1931).

TABLEAU V. — INDICES D'OOGONES FERTILES O ET INDICES DU TOTAL DE SPOROCYSTES S DANS DIFFÉRENTS MILIEUX VIEUX DE 3 MOIS

	pH initial											
	4,5		5,5		6,0		6,7		7,5		7,9	
	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O	S
P E PH	3	9	3	12	5	16	10	43	18	4	0	0
P E Hy PH	3	5	4	6	11	6	66	51	0	3	0	3
P E Ré PH	1	7	1	20	0	21	0	33	0	3	0	1
P E Thio PH	0	0	5	0	73	5	137	105	0	0	0	0
P E Cys PH	X	X	X	X	24	43	196	46	0(a)	0	0	0
Gel Bark Hy PH	65	4	180	17	450	24	700	66	0	19	0	8

(a) = 130 pour des milieux de PH 7,0.

La courbe des indices de sexualité (fig. 21) fait apparaître une sexualité pour pH 7,0. Les conditions limites sont moins nettes dans les milieux P E Cys PH que dans les milieux P E Hy PH. La grande activité du groupement —SH dans les réactions enzymatiques explique peut-être cette différence (P. THOMAS, 1946).

La question d'un antagonisme dans des inhibitions métaboliques entre la cystéine et les quinones est discutée (W. G. CLARK, 1963).

c) Avec les milieux de Barksdale.

Le milieu de BARKSDALE est excellent pour l'étude de la sexualité (A. W. BARKSDALE, 1960-1962). Il est très favorable pour l'*Achlya flagellata* souche R lorsqu'il contient de la gélose.

Les indices de sexualité sont très élevés, ce qui rend le dénombrement exact difficile. La concentration en gélose influe peut-être sur la production de zygotes (W. J. ROBBINS, 1939) et sur la diffusion de l'oxygène et le potentiel (G. B. REED et J. H. ORR, 1943). Les diverses modifications que j'ai apportées à ces milieux (voir chap. A, II) n'ont pratiquement guère entraîné de différences dans les indices de sexualité. Les mesures de potentiel des milieux Gel Bark Hy PH ont des valeurs voisines de celles des milieux P E Hy PH, mais je n'ai pas fait beaucoup de mesures, car la gélose en freinant la diffusion de l'oxygène constitue un facteur supplémentaire gênant. La profondeur atteinte par l'électrode également. A. R. PRÉVOT (1939) montre que le gradient qui s'établit dans la gélose profonde permet de distinguer sept types respiratoires chez les Bactéries. Certaines zones de la gélose sont très peu épaisses (A. R. PRÉVOT, 1960; P. KAISER, 1963).

Avec un Champignon tel que l'*Achlya flagellata* qui mène une vie aérobie, le mycélium reste superficiel. D'autre part, la présence de méthionine ou de cystéine n'est pas favorable à une mesure de potentiel.

La seule chose intéressante à noter est l'arrêt de la sexualité pour des pH supérieurs à 7,0, ce qui confirme les résultats obtenus avec les milieux P E Hy PH.

En résumé, dans ces diverses conditions expérimentales :

1° La sexualité a lieu essentiellement en milieu acide.

2° Les conditions optimales pour la sexualité sont réalisées pour pH 6,7 - 6,8.

3° La production des hormones qui déclenchent la sexualité a lieu dans des milieux de potentiel d'oxydo-réduction supérieur à +310 mV. Ce qui donne un potentiel de +360 mV en présence d'oxygène.

4° La dissymétrie des courbes des figures 17 et 21 conduit à penser que ces conditions optimales correspondent à des conditions limites. La sexualité apparaît comme étant la réaction du Champignon en face d'un barrage physico-chimique qui bloque probablement certaines réactions du métabolisme.

E. — HYPOTHÈSE ET ÉTUDE CRITIQUE
D'UNE INFLUENCE DU POTENTIEL DU MILIEU
SUR LA CHAÎNE RESPIRATOIRE
AU NIVEAU DES CYTOCHROMES

I. — POTENTIEL ET pH

Le problème qui se pose est de savoir si, dans la biologie de l'*Achlya flagellata*, c'est le pH ou le potentiel d'oxydo-réduction qui a le plus d'influence sur le déterminisme de la sexualité.

Dans les séries d'expériences que j'ai réalisées, les potentiels sont restés très voisins pour une valeur donnée du pH, ce qui ne permet pas de donner une réponse nette. Ceci peut provenir de deux facteurs. Les substances qui diffusent depuis le bois imposent dans une large part leur potentiel propre, ou bien le *Champignon* n'est pas capable de réduire davantage le milieu en présence d'oxygène.

Le tableau IV permet de comparer l'influence du potentiel et du pH sur la reproduction sexuée. Il met en évidence l'importance du potentiel et montre que le pH n'intervient pas seul. Il est établi pour des cultures vieilles de 1 mois. A cette date les cultures stériles restent stériles, l'induction de la sexualité est faite. Le potentiel mesuré correspond au potentiel d'oxydo-réduction (voir chap. A, VI).

Les milieux P E Hy PH étant pris comme référence il est net que dans les milieux P E PH, dont le potentiel est plus élevé, la sexualité est à la fois présente en milieu légèrement basique, et moins intense. Tandis que, dans les milieux P E Ré PH, dont le potentiel est plus bas, la sexualité est faible et limitée aux milieux acides. Ces milieux de pH 4,5 et 5,5 ne sont pas très favorables à la sexualité. Comme elle existe, je pense que cela est uniquement dû à un potentiel favorable (fig. 11).

Dans les milieux P E PH les conditions limites sont moins bien définies et la reproduction se prolonge dans les milieux légèrement basiques. Je n'ai pas fait une étude détaillée de l'évolution du potentiel de ces milieux, mais les quelques séries de mesures effectuées montrent que la chute de potentiel au moment de la croissance est beaucoup plus faible que dans les milieux P E Hy PH, alors que dans les milieux P E Ré PH elle est au contraire sensiblement plus forte.

Les milieux P E Hy PH permettent la réaction sexuelle la plus nette. C'est pourquoi ils ont été choisis afin de réaliser l'étude faite au chapitre C (en excluant les milieux enrichis en groupements thiols).

II. — POTENTIEL ET OXYGÉNATION

L'influence de la concentration en oxygène sur la reproduction sexuée a été reconnue chez un certain nombre de Champignons (voir la bibliographie dans L. E. HAWKER, 1966 et G. TURIAN, 1969).

Les résultats obtenus par F. E. DENNY (1933) sur le *Neurospora* montrent qu'il existe une concentration limite en oxygène très faible, en dessous de laquelle il n'y a plus de reproduction.

Le problème est de savoir si le déterminisme de la sexualité est contrôlé par la teneur du milieu en oxygène ou par le potentiel d'oxydo-réduction.

Les expériences de G. B. REED et J. H. ORR (1943), puis de J. E. KEMPF et P. SAYLER (1946) montrent que l'introduction d'oxygène dans un milieu de culture élève le potentiel du milieu.

Ici l'influence de l'oxygène est la même dans tous les milieux P E Hy PH. Au départ tous les milieux sont en équilibre avec l'oxygène atmosphérique, quelles que soient les valeurs du pH. Ce n'est pas l'oxygène qui intervient du 8^e au 15^e jour pendant la période d'induction (fig. 13).

Avec des pH nettement différents la consommation d'oxygène est simplement légèrement différente. Il est possible que le premier facteur influe directement sur le second par l'intermédiaire d'une action enzymatique (K. OKUNUKI, 1964).

Les droites des milieux de cultures acides sur la figure 7 ont des pentes voisines de 0.06. Elles sont donc pratiquement parallèles aux droites du rH₂ (M. HUYBRECHTS, 1947; W. M. CLARK, 1960).

Puis il y a une nette cassure dans chaque droite au niveau du raccord avec les milieux basiques et voisins de la neutralité. La pente est alors de 0,02 environ. C'est précisément dans ces milieux que les problèmes posés par la sexualité apparaissent.

La représentation graphique du potentiel d'oxydo-réduction mesuré sous courant d'azote à 1 mois (voir fig. 7 et 12) montre que la cassure apparaît également. Donc qu'il y ait de l'oxygène ou non, le même problème se retrouve au sujet du potentiel d'oxydo-réduction.

Il semble que le Champignon éprouve des difficultés à abaisser le potentiel du milieu de culture lorsqu'il atteint +310 mV pour pH 6,8. Une élévation du pH initial de 1,2 entre pH 6,7 et pH 7,9 (fig. 7 et 10) se traduit seulement par une baisse du potentiel d'oxydo-réduction de 15 mV. Par ailleurs, l'amplitude des différents potentiels est considérable.

Il est certain que l'activité relative des cytochromes est modifiée lorsque le potentiel d'oxydo-réduction du milieu extérieur varie de +410 mV pour pH 4,5 à +295 mV pour pH 7,9.

III. — POTENTIEL ET QUINONES

Tous les milieux à base de rameaux de Pommier contiennent des quinones et des phénols.

a) *Rôle d'accepteur d'hydrogène dans le milieu.*

De nombreuses substances des milieux de culture peuvent jouer un rôle d'accepteur d'hydrogène, ce qui explique les baisses de potentiel des milieux placés en anaérobiose (R. GAUTHERET, 1939). Les quinones peuvent faire de même. Ce rôle est probablement important dans le fond mal oxygéné des étangs, mais il n'est que transitoire dans les cultures P E Hy PH en présence d'air.

L'existence d'oxydases capables d'activer l'oxygène étant probable dans les milieux contenant des rameaux de Pommier, l'oxydation de l'hydroquinone peut se faire rapidement (H. MUSSO, 1967). Les enzymes ne sont pas forcément nécessaires (L. L. INGRAHAM, 1964).

Ainsi les quinones se trouvent, d'une part, en présence du Champignon qui fonctionne comme un donneur de protons et d'électrons et, d'autre part, en présence de l'oxygène du milieu qui est l'accepteur définitif de l'hydrogène.

Dans la figure 24 sont représentées deux voies possibles pour l'évacuation des protons H^+ et des électrons e^- . L'une empruntant la voie mitochondriale de la chaîne respiratoire complète, l'autre utilisant la possibilité offerte par les quinones du milieu d'accepter les protons et les électrons. On sait que les échanges ioniques au niveau de la membrane peuvent se traduire par un rejet de protons H^+ et d'électrons e^- dans le milieu extérieur (E. J. CONWAY, 1953-1955).

Ces deux voies conduisent à une consommation d'oxygène, il n'est pas étonnant que les mesures de tension d'oxygène aient donné des résultats voisins dans des milieux de pH différents, que la respiration se fasse par la chaîne des cytochromes dans le mycélium ou par l'intermédiaire de la quinone jouant un rôle d'accepteur d'hydrogène dans le milieu de culture.

b) *Rôle d'accepteur d'hydrogène dans le mycélium.*

A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET (1940-1946) ont montré que le rôle des colorants comme transporteurs d'hydrogène est important chez le *Saccharomyces ellipsoïdeux* ou l'*Oïdium lactis*. Le colorant est absorbé, réduit, puis excrété dans le milieu de culture. Cette excrétion est très rapide chez les Levures. Ce n'est qu'après cette excrétion que la croissance commence.

Chez le *Saprolegnia* le mécanisme est le même, mais il est beaucoup

plus lent et il dépend des conditions de culture. A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET insistent sur le fait que chez le *Saprolegnia* le rôle des colorants comme transporteurs d'hydrogène est plus faible que chez les Levures. Par ailleurs les leucodérivés, mis à part le vert Janus, pénètrent dans les cellules vivantes moins facilement que la forme oxydée du colorant. Le *Saprolegnia* réduit le vert Janus en son dérivé rose, même dans les milieux exposés à l'air.

Dans les milieux P E Hy PH il est possible que la quinone, sous la forme oxydée, pénètre dans le cytoplasme. Si cela se produit, après réduction, c'est-à-dire prise en charge des protons H^+ et des électrons e^- , l'hydroquinone serait excrétée dans le milieu extérieur comme les colorants vitaux.

Dans ce cas, la réduction en hydroquinone est instantanée dans les filaments mycéliens en croissance active, car le cytoplasme garde un bel aspect translucide blanc bleuté. Lorsque les filaments mycéliens meurent, le cytoplasme se colore rapidement en jaune-brun; cela pourrait être provoqué par une oxydation sur place des quinones.

c) Rôles variés des quinones dans le mycélium.

L'intervention des quinones dans les phosphorylations photosynthétiques (A. TREBST, 1963; C. COSTE, 1965) ou les phosphorylations oxydatives de la respiration est toujours couplée à un transport d'électrons. Certaines sont bien connues (J. BATS, C. GERVAIS et Y. COIC, 1962), mais leur rôle est souvent discuté (B. T. STOREY, 1968; A. R. PRÉVOT et P. KAISER, 1963).

Il est possible que l'hydroquinone intervienne dans des échanges d'électrons directement avec le cytochrome *c* (K. OKUNUKI, 1964).

Il est peu probable que le pH varie notablement à l'intérieur du cytoplasme, même dans des milieux de culture de pH très différents. Il y a donc dans le mycélium des quinones dont le potentiel est stabilisé par le pH lorsque les conditions d'aérobiose sont constantes, mais qui peuvent être plus ou moins réduites lorsque la tension en oxygène du milieu de culture baisse, de même que les autres composants de la chaîne respiratoire (B. CHANCE et G. R. WILLIAMS, 1956).

Certains auteurs admettent que des quinones interviennent juste avant les cuproprotéines dans l'oxydo-réduction terminale de la chaîne respiratoire (H. R. MAHLER et E. H. CORDES, 1967). Cette question est discutée. W. O. JAMES (1953) considère que le couple catéchol/orthoquinone peut s'associer avec l'oxydo-réduction de cuproprotéines juste avant l'activation de l'oxygène, et ceci en présence d'une polyphénol-oxydase issue d'un Champignon.

Cette hypothèse est critiquée et rejetée par certains auteurs (J. H. BURNETT, 1968).

De toute façon, le rôle des quinones vis-à-vis de la reproduction des Champignons est une question qui se pose (A. E. FLOOD et D. S. KIRKHAM, 1960).

IV. — POTENTIEL ET CYTOCHROME-OXYDASE

Les variations du pH et de l'oxygénation, qui ont une incidence sur le potentiel des milieux et sur le pourcentage d'oxydation ou de réduction des quinones, influent également sur de nombreux corps et en particulier sur les cytochromes.

La cytochrome-oxydase est peut être en cause pour plusieurs raisons :

1° *Le potentiel d'oxydo-réduction des milieux P E Hy PH 6,7* dépourvus d'oxygène est de +310 mV (ce qui correspond à un potentiel de +305 mV à pH 7).

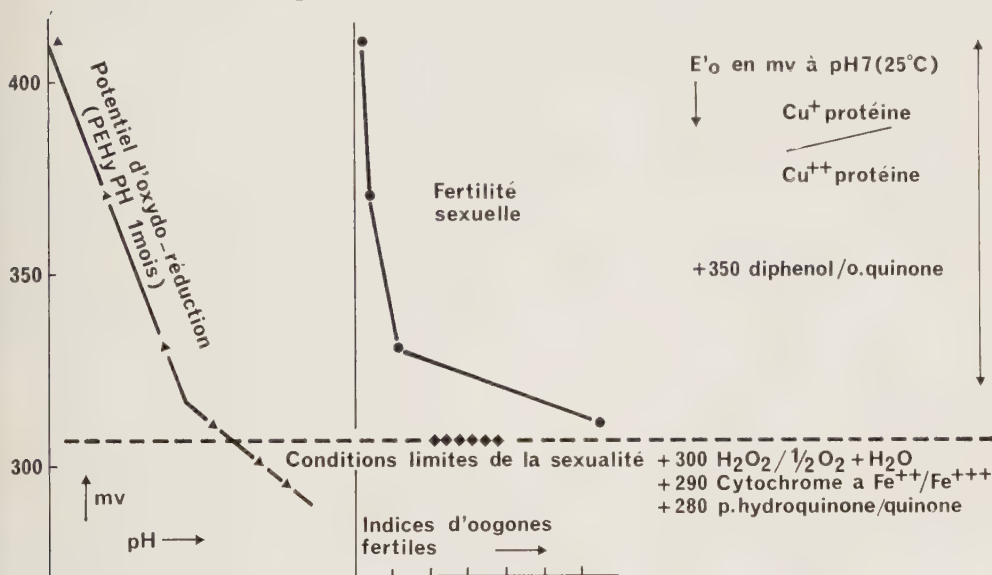


FIG. 23. — Comparaison entre le potentiel d'oxydo-réduction du milieu, la fertilité sexuelle et le potentiel E'_0 de systèmes oxydo-réducteurs importants.

Le potentiel du milieu de culture se situe donc au voisinage du potentiel E'_0 à pH 7, du cytochrome *a* de la cytochrome-oxydase (fig. 23).

La question de la nature de la cytochrome-oxydase est discutée (Hr. W. D. BONNER, 1968), de même que la valeur du potentiel E'_0 des cytochromes *a*₃ et *c*. B. CHANCE et B. HESS (1962), B. CHANCE (1968) ont montré que la cytochrome-oxydase est un hexamère comprenant 4 hèmes *a* et 2 hèmes *a*₃ associés à 2 ou 6 atomes de cuivre (M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, 1967).

Le rôle de cuproprotéines dans l'oxydo-réduction terminale de la chaîne respiratoire est connu depuis longtemps. Elles font partie du complexe IV de la chaîne respiratoire (Y. HATEFI, 1966; H. R. MAHLER et E. H. CORDES, 1967).

2° *La cytochrome-oxydase est auto-oxydable.* — Elle livre directement ses électrons à l'oxygène. C'est la voie respiratoire normale des organismes aérobies (CL. LIORET, 1963) abondamment pourvus de mitochondries.

3° *Tant que le potentiel du milieu de culture* est supérieur au potentiel de la cytochrome-oxydase, les oxydo-réductions de la chaîne respiratoire doivent se réaliser normalement. Le transfert des électrons n'est pas perturbé. Le potentiel du cytochrome a_3 est très élevé en présence d'oxygène (B. CHANCE et G. R. WILLIAMS, 1956).

La mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans le milieu de culture donne une valeur de +305 mV pour pH 7, alors que le cytochrome a_3 possède un potentiel E'_0 de +550 mV (M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, 1967) et le cytochrome a possède un potentiel E'_0 de +290 mV.

J'admets que le renversement des phosphorylations de la chaîne respiratoire ne peut se faire que dans des cas très particuliers, ceux dont parlent M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS (1967).

Donc lorsque le potentiel du milieu est beaucoup plus bas que celui du cytochrome a_3 , le raisonnement qui explique le passage des électrons d'un niveau énergétique élevé à un niveau énergétique plus bas, ne s'applique plus. Il est difficile d'admettre que les électrons qui sont transférés entre des corps dont le E'_0 à pH 7 est ordonné de façon régulièrement croissante du NAD au cytochrome a_3 , puissent migrer dans un milieu où le potentiel est inférieur au dernier terme de la série, sans modifier tout l'équilibre dynamique des potentiels d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire.

Il est vrai que le dernier terme cède ses électrons à l'oxygène gazeux et non aux substances électro-actives du milieu. Mais les expériences réalisées par A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET (1946), E. J. CONWAY et R. P. KERNAN (1955), montrent que le Champignon cède des électrons et des protons aux substances électro-actives du milieu. Il y a donc une perturbation de cet échange, même si dans les milieux P E Hy PH l'oxygène est encore utilisé.

La nature de la cytochrome-oxydase soulève d'autres problèmes. La question de savoir si les cytochromes a et a_3 appartiennent à la même chaîne ou à deux chaînes parallèles de transport d'électrons, prend de l'intérêt ici (A. L. LEHNINGER, 1964). D'autre part, les flavoprotéines au cours de leur activité peuvent osciller entre la forme oxydée et la forme semi-quinone (M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, 1967).

Il est probable que la cassure dans les courbes de potentiel des milieux de culture (fig. 7) traduit un changement de régime dans le transfert des électrons dans les mitochondries, la physico-chimie nous apprend que la pente $\frac{dV}{dpH}$ est déterminée par le nombre d'électrons et le nombre de protons mis en cause.

Dans ce cas l'électro-activité du milieu est à l'image de l'électro-activité du mycélium. Il est possible que dans les oxydations terminales

l'écoulement des électrons (A. L. LEHNINGER, 1964-1965) puisse suivre plusieurs voies différentes. Les expériences présentées dans ce mémoire ne permettent pas de répondre à ces questions, mais elles permettent de les poser.

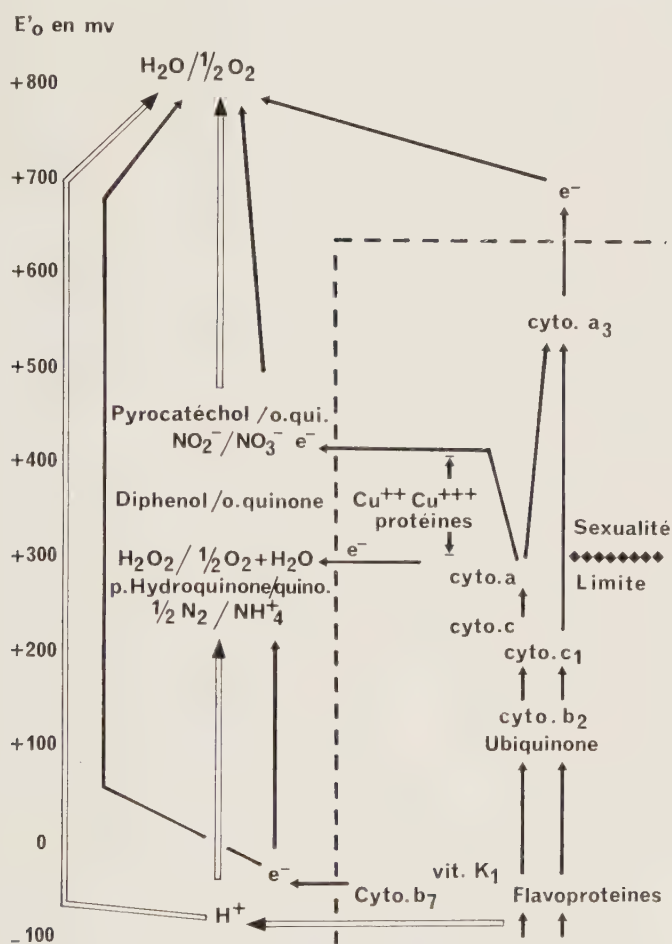


FIG. 24. — Les voies possibles du transfert théorique des protons H^+ et des électrons e^- .

L'intervention de la cytochrome-oxydase a déjà été envisagée par plusieurs auteurs (E. C. CANTINO, J. LOVETT et E. A. HORENSTEIN, 1957; G. TURIAN, 1969). Mais le potentiel Red Ox (comme la concentration en ions H^+) peut également influencer d'autres enzymes n'appartenant pas à la chaîne respiratoire.

V. — ACTION D'UN INHIBITEUR RESPIRATOIRE

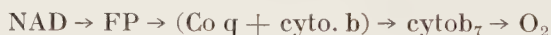
L'azoture de sodium ou azide à la concentration de $M. 10^{-3}$, agirait comme le cyanure sur le cytochrome a_3 , mais pas sur le cytochrome a (A. LINDENMAYER, 1965; M. FLORKIN et E. SCHOFFENIELS, 1967).

J'ai réalisé plusieurs séries de cultures en ensemençant des milieux P E Az PH avec des souches fertiles. La descendance était fertile dans P E Hy PH ensemençés en même temps, mais il n'y a jamais eu de sexualité dans les cultures en milieux P E Az PH, quel que soit le pH, alors que les potentiels d'oxydo-réduction évoluaient normalement.

Je n'ai employé que cet inhibiteur, car l'*Achlya flagellata* souche R a perdu son aptitude à se reproduire intensément au cours d'autres transplantations. Je n'ai donc pas pu multiplier ce type d'expérience.

Dans les cultures P E Az PH, la croissance végétative est ralentie environ à 50 %. Je suis conduit à la même conclusion que C. LANCE (1963) : l'azide ne bloque pas complètement la respiration. Un autre mécanisme ou d'autres oxydases interviennent. Il s'agit peut-être d'une voie empruntant le cytochrome a sans emprunter le cytochrome a_3 (fig. 24).

Une respiration insensible au cyanure est connue chez le *Candida albicans* (J. M. WARD et W. J. NICKERSON, 1958). L'intervention de la flavine-oxydase peut être envisagée (H. BEEVERS, 1961). Mais l'explication la plus plausible (J. M. BURNETT, 1968) est l'intervention du cytochrome b_7 auto-oxydable (CL. LIORET, 1963)



L'influence de l'azide met simplement en évidence un rôle initial d'une enzyme contenant du fer ou du cuivre, mais il est probable que le mécanisme biochimique qui conduit à la différenciation sexuelle se situe à un niveau de la chaîne métabolique différent de celui des phosphorylations oxydatives.

VI. — CONSIDÉRATIONS SUR LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

Il est seulement question ici de présenter quelques points particuliers, à la lumière des travaux de B. CHANCE et G. R. WILLIAMS (1956).

1° Dans les mitochondries, placées dans des conditions d'aérobiose, le potentiel d'oxydo-réduction des composants de la chaîne respiratoire, soit E_h , est différent du potentiel E'_0 correspondant à 50 % de forme réduite. Le potentiel E_h mesuré est toujours plus élevé et il fait apparaître que le quotient $\frac{Ox}{Red}$ est différent de 1.

En l'absence de substrat tous les éléments de la chaîne sont oxydés au maximum et, en l'absence d'oxygène, tous les éléments de la chaîne sont fortement réduits.

Ces mesures sont réalisées par voie spectroscopique, en présence ou en absence d'oxygène dans des conditions d'équilibre dynamique réel.

Elles traduisent les variations de pourcentage entre la forme réduite et la forme oxydée suivant les courbes de PETERS (M. HUYBRECHTS, 1947). Généralement, ces courbes sont décalées de 60 mV par unité de pH et nous pouvons raisonner ainsi, bien que dans le détail il puisse y avoir des différences dans la forme des courbes suivant le pH; c'est le cas des courbes de B. ELEMA (R. WURMSER et R. BANERJEE, 1964).

On peut admettre que le pH, dans les mitochondries comme dans le cytoplasme, reste sensiblement fixe (G. DEYSSON, 1965). Dans ces conditions, les mesures du E_h faites par B. CHANCE et G. R. WILLIAMS (1956) montrent, à pH constant, que le potentiel des différents cytochromes s'élève en même temps que le pourcentage des formes oxydées dans de bonnes conditions d'aérobiose. Dans ce cas, la respiration est rapide et le facteur limitant est la chaîne respiratoire elle-même.

2° La teneur en oxygène n'est pas le seul facteur qui contrôle la proportion des formes oxydées et réduites, et par ce fait le potentiel, même en aérobiose.

Lorsque l'intervention de l'ADP (adénosine diphosphate) est supprimée, le pourcentage des formes oxydées diminue, alors que la teneur en oxygène est la même. Pour le NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide), la forme réduite dépasse 99 %, alors qu'elle est de 53 % lorsque les phosphorylations oxydatives s'effectuent normalement. A l'inverse, le cytochrome *a* est oxydé à 100 % en absence d'ADP.

Il est même probable que c'est la teneur en ADP qui stimule la respiration, contrairement à l'opinion classique qui admet un contrôle des réactions endergoniques par la respiration (M. FLORKIN et E. SCHOFFE-NIELS, 1967).

Cette question est controversée (E. C. SLATER, 1964), elle dépasse le cadre des expériences réalisées ici, mais elle permet de montrer jusqu'à quel point les proportions des formes réduites et oxydées sont variables dans la chaîne respiratoire en fonction de facteurs qui ne sont pas forcément l'oxygène.

VII. — ESSAI DE MISE AU POINT ET HYPOTHÈSE

Nous venons de constater qu'un faisceau d'observations et d'expériences met en évidence le rôle probable du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, dans le déterminisme de la sexualité, pendant les 8 à 15 premiers jours de la vie du Champignon.

Comme la tension en oxygène est sensiblement la même pour les

différents pH, il ne semble pas que ce facteur intervienne dans la détermination des conditions limites de la sexualité.

Par contre, le potentiel n'est pas le même, il est d'autant plus bas que le pH est plus élevé.

Dans le mycélium le problème se présente autrement. Etant donné que dans les mitochondries le pH est fortement tamponné par les protéines, c'est la proportion des formes oxydées et des formes réduites qui varie.

J'émet l'hypothèse que, même en présence d'oxygène, le fonctionnement de la cytochrome-oxydase est contrôlé par le potentiel d'oxydo-réduction du milieu.

Lorsque le potentiel dans les milieux de culture baisse, il est possible que plusieurs voies de remplacement s'établissent, car lorsque la proportion de la forme oxydée du cytochrome a_3 et du cytochrome a diminue, ces transporteurs deviennent beaucoup moins aptes à accepter des électrons.

Si cela se produit effectivement, le potentiel de tous les éléments de la chaîne respiratoire varie et il est possible qu'un autre mécanisme respiratoire se substitue au précédent, par exemple la voie des cytochromes b_7 auto-oxydables (CL. LIORET, 1963; J. H. BURNETT, 1968). Cette modification du métabolisme aurait comme effet le plus apparent une modification de la sexualité (G. TURIAN, 1960).

VIII. — LE DÉTERMINISME DE LA SEXUALITÉ

La pression en oxygène étant la même dans les milieux de culture, le pH étant le même dans le cytoplasme des différentes souches, il n'y a pas de raisons pour que le potentiel d'oxydo-réduction de la cytochrome-oxydase ne soit pas le même dans tous les mycéliums des cultures en milieux P E H₂ PH.

Le potentiel du milieu extérieur varie à côté de cette valeur intramycélienne fixe. Le potentiel d'oxydo-réduction baisse lorsque le pH s'élève. (Le rH₂ est le même entre pH 4,5 et pH 6,0.)

C'est au moment où le potentiel d'oxydo-réduction du milieu atteint presque le E'_0 du cytochrome a que la sexualité subit une perturbation capitale. C'est-à-dire pour une valeur de +310 mV à pH 6,8 (fig. 23).

Lorsque le milieu offre un potentiel Red-Ox supérieur à ce potentiel, la sexualité se déroule normalement.

Lorsque le milieu offre un potentiel Red-Ox voisin de +310 mV, la sexualité subit une amplification maximale.

Au-dessous de cette valeur la sexualité est bloquée, mais la croissance végétative continue.

Bien qu'il soit difficile de faire une démonstration irréfutable, j'émet l'hypothèse que la baisse du potentiel d'oxydo-réduction au niveau des transporteurs mitochondriaux provoque dans le métabolisme une per-

turbation qui joue un rôle décisif dans le déterminisme de la sexualité. Il est évident que ce n'est pas la seule cause possible.

A l'appui de cette hypothèse viennent s'ajouter les faits suivants :

1° Entre pH 6,0 et pH 6,7, il y a une coïncidence entre l'intensité de la reproduction sexuée et la cassure observée dans la courbe du potentiel d'oxydo-réduction.

2° L'influence inhibitrice de l'azide souligne le rôle probable de la cytochrome-oxydase.

3° Le fait que la tension en oxygène est la même, dans des milieux où la sexualité est différente, montre que l'oxygène n'est pas le facteur principal.

L'oxygène reste cependant indispensable pour la sexualité. Le potentiel élevé des milieux de culture correspond sensiblement au potentiel de l'eau oxygénée dont le $E'_0 = +300$ mV à pH 7,0. Les courbes de potentiel des milieux de cultures (fig. 8, 9, 10) ressemblent aux courbes des milieux de culture des Bactéries où du peroxyde d'oxygène peut être détecté (L. F. HEWITT, 1931).

La reproduction sexuée exige une bonne oxygénation, comme chez les autres Champignons, alors que la croissance végétative est moins exigeante vis-à-vis de ce facteur. Dans les milieux P E Hy PH, les conditions nutritives et les conditions d'oxygénation étant assurées, la sexualité est surtout sensible au potentiel d'oxydo-réduction.

F. — CONCLUSIONS

I. — CONCLUSIONS CONCERNANT LE MÉTABOLISME

a) *La gélose* apporte des substances indispensables au développement normal de l'*Achlya flagellata* souche R. Ces substances se retrouvent dans les rameaux de Pommier. Il s'agit peut-être de biocatalyseurs.

b) *De l'ammoniaque ou des ions NH_4^+* sont rejetés dans le milieu de culture, quel que soit le pH, par un mécanisme d'exsorption (R. HELLER, 1969).

c) *En aérobiose, le développement* du Champignon se traduit par une importante consommation d'oxygène. Les expériences réalisées confirment les idées généralement admises que les Saprologénies ne réalisent pas de fermentations. En présence d'accepteurs d'hydrogène il est probable que le mycélium peut vivre au voisinage de l'anaérobiose.

d) *La vie ralentie* qui s'installe dans les souches vieilles de 3 mois révèle une activité réductrice de 50 mV à 60 mV qui est probablement liée au métabolisme minimal du cytoplasme.

e) *Le transport des électrons* dans la chaîne respiratoire est probablement modifié pour pH 6 - 6,2. Cela se traduit par une cassure dans les droites représentant le potentiel des milieux de culture de type P E Hy PH en fonction du pH et par un accroissement brutal de la sexualité qui atteint son maximum pour pH 6,8.

f) *Le métabolisme respiratoire* utilisant la voie principale de la cytochrome-oxydase semble être perturbé pour un pH 6,8 et un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à +310 mV. L'abaissement du potentiel et l'action inhibitrice de l'azide ont le même effet sur la sexualité.

Il est possible qu'une voie respiratoire normalement secondaire, utilisant le cytochrome b_7 auto-oxydable, insensible à l'azide, assure alors la vie du mycélium sans permettre la reproduction sexuée.

La question de savoir si le transfert d'électrons peut emprunter successivement ou parallèlement les cytochromes a et a_3 peut se poser au sujet du déterminisme de la sexualité.

II. — CONCLUSIONS CONCERNANT LA PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

a) La concentration en ions H^+ dans les milieux et la *reproduction asexuée* sont liées de façon étroite. Au point de vue quantitatif la production de sporocystes passe par un maximum net pour pH 6,8.

Au point de vue qualitatif, les zoospores mobiles sont presque uniquement libérées dans les milieux acides. Des sporocystes de type *Dic-tychus* apparaissent parfois dans les pH les plus acides (pH 4,5). La germination immédiate des spores s'observe surtout dans les milieux voisins de la neutralité. Les germinations de type *Aplanes* se rencontrent exclusivement dans les milieux neutres ou basiques.

La libération des zoospores dans les milieux confinés se réalise incomplètement. Elle est totale et massive dans les milieux perfusés, ce qui tend à mettre en évidence le rôle inhibiteur des déchets du métabolisme ou des produits d'exsorption tels que l'ammoniaque (S. B. SALVIN, 1942).

b) La concentration en ions H^+ et la *reproduction sexuée* sont également liées, le maximum d'oogones fertiles se rencontre dans les milieux de pH 6,7 - 6,8. Mais un phénomène nouveau apparaît : la sexualité est inhibée dans les milieux neutres et basiques.

Les différences rencontrées pour les milieux P E PH et les milieux P E Cys PH sont très faibles. Tous les milieux font apparaître l'existence de conditions limites, au-delà desquelles la reproduction sexuée n'est plus possible.

c) *Le potentiel d'oxydo-réduction et la tension d'oxygène* jouent également un rôle.

Dans les milieux de culture P E Hy PH vieux de 18 jours, les conditions limites de la sexualité sont définies par les valeurs pH 6,7 - 6,8, potentiel d'oxydo-réduction +310 mV, potentiel mesuré dans le milieu à l'air +360 mV, teneur du milieu en oxygène par rapport à la saturation 64 %.

Les comparaisons effectuées font apparaître le potentiel d'oxydo-réduction comme le facteur le plus significatif.

Dans les milieux de culture P E Hy PH il faut que le potentiel d'oxydo-réduction à pH 6,8 à 23° C soit supérieur à +310 mV pour que la sexualité ait lieu. Elle atteint son intensité maximale pour cette valeur.

d) *L'hydroquinone* introduite dans le milieu renforce la réaction sexuelle du Champignon. La benzoquinone joue peut-être un rôle comme accepteur d'hydrogène, de même que les autres quinones du milieu.

Il est possible que l'apparition d'une assez forte proportion de quinones oxydées dans les milieux neutres ou basiques provoque une inhibition de la sexualité. On sait que certaines quinones sont employées comme fongicides (J. G. HORSFALL, 1956).

e) *Un antagonisme cystéine-quinone* se manifeste dans les milieux P E Cys PH où la courbe des indices de la sexualité fait moins bien apparaître la notion de conditions limites.

Cette notion se retrouve dans les milieux de BARKSDALE.

Les thiols sont tous favorables à la croissance et à la sexualité. La réaction avec la thio-urée est encore plus nette qu'avec l'hydroquinone.

f) *L'azide et l'acide borique* inhibent la sexualité et ralentissent la croissance.

L'inhibition par l'azide met en évidence le rôle possible de la cytochrome-oxydase dans le métabolisme assurant la sexualité.

III. — CONCLUSIONS CONCERNANT LA POSITION DE LA MÉIOSE DANS LE CYCLE SEXUEL

Si la méiose est sous la dépendance d'une abondance en ions K^+ comme chez les Levures, elle est indépendante de la gamétogenèse. La gamétogenèse a lieu dans des milieux où les ions K^+ ne sont qu'à l'état de traces dans le substrat nutritif.

On peut donc continuer à admettre qu'elle est liée à la germination du zygote, bien que cette question soit actuellement controversée.

IV. — CONCLUSIONS CONCERNANT LA TAXONOMIE

Des sporocystes des types *Achlya*, *Aplanes*, *Dictyuchus* et *Thraustotheca* peuvent se former chez l'*Achlya flagellata* Coker souche R. Un facteur extérieur au Champignon, le pH du milieu, influe nettement sur l'apparition de ces différents sporocystes.

Les anciens taxonomistes utilisaient ces types de sporocystes pour la détermination des différents genres. C'est un mauvais critère. Le genre *Aplanes* devrait être supprimé et peut-être aussi les genres *Thraustotheca* et *Dictyuchus*. Aucune diagnose de Saprologniée ne devrait être donnée sans une définition rigoureuse des conditions de culture.

La morphologie des sporocystes est sous la dépendance de la physiologie. Seuls les gamétocystes, et en particulier les caractères des oogones, offrent des critères qui ont une valeur pour la désignation des espèces. T. W. JOHNSON Jr. (1956) exprime déjà ces idées pour les *Achlya*, mais je pense qu'elles devraient être étendues à l'ensemble des Saprologniées.

V. — CONCLUSIONS CONCERNANT L'ÉCOLOGIE

1° *Le pH et la vie végétative.*

L'*Achlya flagellata* souche R se développe de pH 4,5 à pH 8,4. C'est un Champignon peu exigeant pour sa vie végétative au point de vue du pH.

Lorsque la multiplication asexuée est modifiée, elle permet toujours une transplantation soit par des formes flagellées mobiles dans les milieux acides, soit par des aplanospores ayant commencé leur germination dans les milieux basiques.

2° *Les exigences de la sexualité.*

Les exigences de la sexualité sont au contraire très étroites. Pour fournir de bonnes conditions, il faut un pH de 6,2 à 6,8, un potentiel d'oxydo-réduction qui ne descende pas en dessous de +310 mV et une tension d'oxygène de l'ordre de 60 % par rapport à la saturation.

Il y a donc un manque d'harmonie entre les étroites exigences de la sexualité et les assez larges possibilités de la vie végétative.

Il est évident que d'autres facteurs interviennent encore; ils ne sont pas étudiés dans ce mémoire.

3° *Aérobiose et anaérobiose.*

L'habitat des Saprolognées dans des eaux stagnantes riches en débris végétaux, parfois au voisinage de la vase, suggère que ces Champignons sont adaptés à une vie plus ou moins carencée en oxygène. Le fait qu'ils peuvent utiliser le soufre sous la forme de sulfure, et non sous la forme de sulfate, vient renforcer cette idée.

Mais l'étude de la sexualité montre que l'oxygène est indispensable pour réaliser le cycle complet de développement.

Par ailleurs, les Saprolognées sont capables d'utiliser des substances organiques du milieu comme accepteurs d'hydrogène et de vivre ainsi sans réaliser de fermentations. Même chez les organismes aérobies, l'oxygène libre ne semble pas entièrement irremplaçable (R. WURMSER, 1932).

L'*Achlya flagellata* souche R est un organisme aérobie que l'on peut classer dans les mésosaprobies (P. VIVIER, 1952) à cause des caractéristiques de sa vie végétative.

4° *Influence sur le biotope.*

L'*Achlya flagellata* souche R, comme probablement la plupart des Saprolognées, intervient sur les caractéristiques physico-chimiques de son biotope.

En absorbant les sulfures, il se présente comme un utilisateur des réductions bactériennes de la zone des polysaprobies.

En produisant de l'ammoniaque ou des ions NH_4^+ il neutralise l'acidité provenant des fermentations bactériennes. Il joue donc un rôle actif dans l'établissement du pH de son biotope.

VI. — CONCLUSIONS CONCERNANT L'AGRONOMIE

Il serait très utile de savoir si tous les Phycomycètes parasites de végétaux cultivés, en particulier les Péronosporales, ont des réactions semblables à celles de l'*Achlya flagellata* vis-à-vis du pH. De toute façon le problème doit être posé.

Dans l'affirmative il faut éviter tout traitement avec un produit de pH voisin de la neutralité qui favorise et amplifie la reproduction sexuée et asexuée.

Les milieux acides peuvent favoriser la germination des zygotes. Le maximum de garanties sera trouvé avec des traitements basiques, d'un pH au moins de l'ordre de 7,5 ou 8,0.

L'emploi de fongicides à base de dérivés quinoniques n'échappe pas à cette constatation. Pour pH 6,8 une concentration de $1 \cdot 10^{-6}$ g/l d'hydroquinone est toxique pour l'*Achlya flagellata*, mais une concentration de $0,5 \cdot 10^{-6}$ g/l amplifie la reproduction sexuée.

Une forte concentration est toujours toxique, mais la pluie après un traitement entraîne une dilution qui peut amplifier les reproductions sexuées et asexuées, si le milieu est voisin de la neutralité.

Résumé.

L'*Achlya flagellata* Coker est cultivé aseptiquement à partir d'un isolement monosporal en présence de tampons pH et de substances présentant des propriétés électro-actives. Le Champignon modifie le pH et le potentiel d'oxydo-réduction de ses milieux de culture. Son influence sur les milieux de culture permet de distinguer six périodes dans l'activité du mycélium. Les courbes du potentiel sont comparables à celles des Bactéries aérobies.

Le nombre total de sporocystes varie beaucoup entre pH 4,5 et pH 7,9. En outre, l'apparition de sporocystes de type *Achlya*, *Dictyuchus*, *Aplanes*, est sous la dépendance de la concentration en ions H^+ .

Comme chez les *Allomyces*, l'acide borique inhibe la fécondation.

Dans les conditions expérimentales choisies, la concentration en O_2 n'intervient pas dans le déterminisme de la reproduction sexuée. L'induction de la sexualité se fait 8 à 15 jours après l'ensemencement. La reproduction sexuée trouve ses conditions optimales pour pH 6,8. Elle s'effectue presque uniquement en milieux acides et lorsque le potentiel d'oxydo-réduction mesuré sous courant d'azote est supérieur à +310 mV.

La sexualité apparaît comme étant la réaction du Champignon en face d'un barrage physico-chimique qui bloque probablement certaines réactions du métabolisme.

La courbe du potentiel d'oxydo-réduction des milieux de culture aux différents pH, présente une cassure qui traduit une modification dans l'activité réductrice du Champignon. Il y a une nette coïncidence entre cette cassure et la sexualité.

L'activité métabolique liée à la sexualité est probablement différente des phosphorylations oxydatives. Cependant, il y a inhibition totale de la sexualité en présence d'un inhibiteur respiratoire, l'azide $M \cdot 10^{-3}$. Donc, dans les conditions expérimentales choisies, il semble que le bon fonctionnement de la cytochrome-oxydase est indispensable pour la reproduction sexuée, même si des voies respiratoires normalement secondaires peuvent assurer la vie végétative.

Summary.

The pH and the oxidation-reduction potential, sexual and asexual reproduction of a Saprolegniaceae, relationship between organism and environment.

The *Achlya flagellata* Coker, is grown aseptically from single-spore isolation in the presence of buffer solutions and of substances capable of the reversible oxidation-reduction reaction. The Fungus modifies the pH and the oxidation-reduction potential of its own medium. Its

influence on the medium allows us to distinguish six periods in the activity of the mycelium. The curves describing the potential are comparable with those of aerobic bacteria.

The total number of sporangia varies a great deal from pH 4.5 to pH 7.9. Besides, the fact that some sporangia of the *Achlya*, *Dictyuchus*, *Aplanes* types should appear is directly connected with the concentration of H^+ -ions.

As with the *Allomyces*, boric acid inhibits fertilization.

In the conditions chosen for the experiments, the O_2 concentration has no influence on the determinism of sexual reproduction. Sexuality is induced from 8 to 15 days after inoculation. The best conditions for sexual reproduction are to be found for pH 6.8. It occurs almost exclusively in acid media and when the redox potential measured in presence of bubbling nitrogen exceeds +310 mV.

Sexuality thus appears to be the reaction of the Fungus to a physico-chemical stoppage which probably inhibits some of the reactions of the metabolism.

The redox curve of the media at various pH presents a break which corresponds to a change in the reducing action of the Fungus. There is a striking coincidence between this break and sexuality.

We presume the metabolism connected with sexuality to differ from the oxidative phosphorylation. Sexuality, however, is totally inhibited in the presence of a respiratory inhibitor, azide $M. 10^{-3}$. Therefore, in the conditions chosen for the experiments, the adequate functioning of cytochrome-oxidase seems indispensable to sexual reproduction, even if vegetative growth is made possible by respiratory metabolisms that play a minor part in normal conditions.

REMERCIEMENTS

La partie la plus importante de ce travail a été effectuée dans le laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences de Paris, à l'Ecole Normale Supérieure.

A mon Maître, Monsieur le Professeur L. PLANTEFOL, Membre de l'Institut, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude, pour l'aide précieuse et les encouragements qu'il m'a constamment prodigués. Je lui suis très reconnaissant de la bienveillance avec laquelle il m'a accueilli dans son laboratoire et du matériel d'étude qu'il m'a proposé. Je suis heureux de pouvoir lui dire ici toute ma respectueuse affection.

Monsieur le Professeur R. WURMSER, Membre de l'Institut, m'a guidé dans un domaine qui ne m'était pas familier et c'est grâce à ses précieux conseils que j'ai pu approfondir plusieurs chapitres de ce mémoire. Je ne sais comment lui exprimer toute ma reconnaissance. Je dois également le remercier d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir examiné les résultats de mes travaux.

J'adresse mes remerciements à Monsieur R. ULRICH, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, et à Monsieur G. PRÉVOST, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay-Paris, d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues et amis qui m'ont apporté une aide dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- APINIS (A.), 1930. — Untersuchungen über die in Lettland gefundenen Saprolegnia-
ceen nebst Bemerkungen über andere Wasserpilze. *Acta Horti. Bot. Univ. Latv.*,
4, p. 201-246.
- AUBEL (E.), AUBERTIN (E.) et GENEVOIS (L.), 1929. — Sur le potentiel d'oxydo-
réduction de la Levure, des anaérobies facultatifs, des anaérobies stricts et des
milieux où vivent les organismes. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, **5**, p. 1-12.
- ARMSTRONG (W.) et ROTHSTEIN (A.), 1964. — The effect of pH on cation transport
in Yeast. *J. Gen. Physiol.*, **48**, p. 61-71.
- BARBIER (J.), 1950. — Contribution à l'étude de la biologie des Phycomycètes aqua-
tiques. *Rev. Gén. Bot.*, **57**, p. 23-47.
- BARKSDALE (A. W.), 1960. — Inter thallic sexual reactions in *Achlya* a genus of the
aquatic fungi. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 14-23. — 1962. Effect of nutritional deficiency
on growth and sexual reproduction of *Achlya ambisexualis*. *Amer. J. Bot.*, **49**,
p. 633-638. — 1963. The role of hormone A during sexual conjugaison in *Achlya*
ambisexualis. *Mycologia*, **55**, p. 627-632.
- BARY (A. DE) et WORONIN (M.), 1881. — Untersuchungen über die Peronosporen und
Saprolegnien und die Grundlagen eines natürlichen Systems der Pilze. *Beitr.*
Morph. Phys. der Pilze, **4**, p. 1-145.
- BATS (J.), GERVAIS (C.) et COIC (Y.), 1962. — Mise au point d'une méthode de déter-
mination des quinones transporteurs d'électrons des végétaux. *Ann. Physiol. Vég.*,
4, p. 187-210.
- BEEVERS (H.), 1952. — Malonic acid as a inhibitor of Maize root respiration. *Plant*
Physiol., **27**, p. 725-735. — 1961. *Respiratory metabolism in plants*. Row-Peterson,
Evanston, Illinois.
- BERKALOFF (A.), BOURGET (J.), FAVARD (P.) et GUINNEBAULT (M.), 1967. — *Biologie et*
physiologie cellulaire. Hermann, Paris.
- BHARGAVA (K. S.), 1946. — Oogenesis and Fertilisation in *Isoachlya anisospora* var.
indica. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, **29**, p. 101-107. — 1960. Formation and liberation
of zoospores in *Isoachlya anisospora* var. *Indica*. *Bot. Gaz.*, **112**, p. 24-31.
- BILMANN (E.), 1921. — Sur l'hydrogénation des quinhydrones. *Ann. Chim.*, **15**,
p. 109; **16**, p. 321. — 1927. L'électrode à quinhydron et ses applications. *Bull.*
Soc. Chim., **41**, p. 213.
- BOGDANSKI (C.), 1950. — Contribution à l'étude du système oxydo-réducteur des jus
de pommes. *Thèse, dactyl.*, Paris.
- BONNER (W. D. Jr.), 1968. — Cytochromes in plants mitochondria, dans *Electron*
transport in respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **19**, p. 310-316.
- BRUNEL (A.), 1948. — *Traité pratique de chimie végétale*. Georges Frères, Tourcoing
(Nord).
- BURNETT (J. H.), 1968. — *Fundamentals of mycology*. Arnold, London.
- CANTINO (E. C.), 1949. — The physiology of the aquatic Phycomycete *Blastocladia*
pringsheimii, with emphasis on its nutrition and metabolism. *Amer. J. Bot.*, **36**,
p. 95-149. — 1955. Physiology and phylogeny in the water molds, a reevaluation.
Quart. Rev. Biol., **31**, p. 138-149. — 1966. Morphogenesis in Aquatic Fungi (dans
AINSWORTH (G. C.) et SUSSMAN (A. S.) : *The Fungi*, vol. **III**, p. 283-337). Academic
Press, New York.
- CANTINO (E. C.), LOVETT (J.) et HORENSTEIN (E. A.), 1957. — Chitin synthesis and
nitrogen metabolism during differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Amer.*
J. Bot., **44**, p. 498-505.
- CHADEFAUD (M.), 1960. — *Traité de Botanique*, t. I. Masson, Paris.
- CHANCE (B.), 1968. — Electron transport in Mammalian systems. *Ann. Rev. Plant*
Physiol., **19**, p. 295-307.
- CHANCE (B.) et WILLIAMS (G. R.), 1956. — Respiratory chain and oxidative phospho-
rylation. *Adv. in Enzymologie*, **17**, p. 65-134.
- CHAZE (M. J.), 1925. — Essais de culture pure d'une Saprolegniacée. *Bull. Soc. Myc.*
France, **41**, p. 256-277.

- CLARK (W. G.), 1963. — Inhibition of amino acid decarboxylases (dans HOCHSTER R. M. et QUASTEL J. H. : *Metabolic Inhibitors. A comprehensive treatise*, vol. I, p. 346-360). Academic Press, New York.
- CLARK (W. M.), 1960. — *Oxydation reduction potentials of organic systems*. Williams et Wilkins, Baltimore.
- COKER (W. C.), 1923. — *The Saprolegniaceae, with notes on other water molds*. Univ. North Carolina Press, Chapel Hill.
- COKER (W. C.) et MATTHEWS (V. D.), 1937. — Blastocladales, Monoblepharidales and Saprolegniales. *North. American Flora*, **2** (1), p. 1-76.
- CONWAY (E. J.), 1953. — A redox pump for the biological performance of osmotic work, and its relation to the kinetics of free ion diffusion across membrane. *Int. Rev. Cytol.*, **2**, p. 419-445. — 1955. Evidence for a redox pump in the active transport of cations. *Int. Rev. Cytol.*, **4**, p. 377-396.
- CONWAY (E. J.) et O'MALLEY (E.), 1946. — The nature of the cation exchanges during Yeast fermentation with formation of 0,02 N. H⁺ ion. *Biochem. J.*, **40**, p. 59-67.
- CONWAY (E. J.), BRADY (T. G.) et CARTON (E.), 1950. — Biological production of acid and alkali. *Biochem. J.*, **47**, p. 369-374.
- CONWAY (E. J.) et KERNAN (R. P.), 1955. — The effect of redox dyes on the active transport of hydrogen, potassium and sodium ion across the Yeast cell membrane. *Biochem. J.*, **61**, p. 32-36.
- CONWAY (E. J.) et DUGGAN (F.), 1958. — A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.*, **69**, p. 265-274.
- CORNU (M.), 1877. — Causes qui déterminent la mise en liberté des corps agiles (zoospores, anthérozoïdes) chez les végétaux inférieurs. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **85**, p. 860-862.
- COSTE (C.), 1965. — Les quinones des chloroplastes. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, p. 205-238.
- DAYEY (C. B.) et PAPAIVIZAS (G. C.), 1962. — Growth and sexual reproduction of *Aphanomyces euteiches* as affected by oxydation state of sulfur 1.2. *Amer. J. Bot.*, **49**, p. 400-404.
- DENNY (F. E.), 1933. — Oxygen requirements of *Neurospora sitophila* for formation of perithecia and growth of mycelium. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **5**, 95-102.
- DERIBERE (M.), 1949. — *Les applications industrielles du pH et le potentiel d'oxydo-réduction*. 2^e éd. Dunod, Paris.
- DEVSSON (G.), 1965. — *La cellule végétale*. Cours de Botanique générale (2^e éd.). SEDES, Paris.
- DICK (M. W.), 1963. — The occurrence and distribution of Saprolegniaceae in certain soils of south-east England. III. Distribution in relation to pH and water content. *J. Ecol.*, **51**, p. 75-81.
- FAURÉ-FRÉMIET (E.), LÉON (M^{lle}), MAYER (A.) et PLANTEFOL (L.), 1929. — L'oxygène libre et les mouvements des Paramécies. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **101**, p. 627.
- FLOOD (A. E.) et KIRKHAM (D. S.), 1960. — The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two *Venturia* species (dans FRIDHAM J. B. : *Phenolics in plants in health and disease*, p. 81-85). Pergamon Press, Oxford.
- FLORKIN (M.) et SCHOFFENIELS (E.), 1967. — *Biochimie et biologie moléculaire*. Desoer, Belgique.
- GALLAIS (F.), 1957. — *Chimie minérale théorique et expérimentale* (Chimie électro-nique). Masson, Paris.
- GAUTHERET (R.), 1939. — Action du *Saprolegnia diclina* sur le potentiel d'oxydo-réduction des milieux de culture additionnés de colorants. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **131**, p. 616-618.
- GORESLINE (H. E.), 1933. — Studies on agar-digesting bacteria. *Journ. Bact.*, **26**, p. 435-457.
- GRAY (D. W.), 1939. — The relation of pH and temperature to the fruiting of *Physarum polycephalum*. *Amer. J. Bot.*, **26**, p. 709-714.
- GUILLIERMOND (A.) et GAUTHERET (R.), 1940-1946. — Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales. *Rev. Gén. Bot.*, **52**, p. 353-374, 440-496 et **53**, p. 25-44, 75-96, 121-144, 158-192, 212-240, 275-288, 315-336, 362-380.

- HATEFI (Y.), 1966. — The fonctional complexes of the mitochondrial electron transfer system. *Comprehensive biochemistry*, **14**, p. 199-229. Elsevier, Amsterdam.
- HAWKER (L. E.), 1966. — Environmental influence on reproduction (dans AINSWORTH G. C. et SUSSMAN A. S.) : *The Fungi*, vol. II, p. 435-469. Academic Press, New York.
- HAWKER (L. E.) et HEPDEN (P. M.), 1962. — Sporulation in *Rhizopus sexualis* and some other fungi following a period of intense respiration. *Ann. Bot.*, **26**, p. 619-632.
- HELLER (R.), 1969. — *Biologie végétale*. II. Nutrition et métabolisme. Masson, Paris.
- HEWITT (L. F.), 1931. — *Oxydation reduction potentials in bacteriology and biochemistry*. Williams et Wilkins, Baltimore.
- HOHNK (W.) et BOCK (K. J.), 1954. — Ein Beitrag zur ökologie der saprophytischen wasserpilze. *Veroeffentl. Inst. Meeresf. Bremerhaven*, **3**, p. 9-26.
- HORSFALL (J. G.), 1956. — *Principles of fungicidal action*. Waltham, Massachusetts.
- HUYBRECHTS (M.), 1947. — *Le pH et sa mesure. Les potentiels d'oxydo-réduction, le rH*. 4^e éd. Masson, Paris.
- INGRAHAM (J. L.) et EMERSON (R.), 1954. — Studies of the nutrition and metabolism of the aquatic phycomycete, *Allomyces*. *Amer. J. Bot.*, **41**, p. 146-152.
- INGRAHAM (L. L.), 1964. — Enzymatic activation of oxygene. *Comprehensive biochemistry*, **14**, p. 424-444.
- JAMES (W. O.), 1953. — *Plant respiration*. Clarendon Press, Oxford.
- JOHNSON, JR. (T. W.), 1951. — An isolate of *Dictyuchus* connecting the falsenet and true-net species. *Mycologia*, **43**, p. 365-372, 728-729. — 1952. Notes on the taxonomy of the *Achlya flagellata*, *Achlya imperfecta* complex. *Mycologia*, **44**, p. 239-244. — 1956. *The genus Achlya : morphologie and taxonomy*. Univ. Michigan, Ann. Arbor.
- KAISER (P.), 1963. — Aspect du métabolisme respiratoire des Bactéries (dans THOMAS J. A. : *Problèmes de métabolismes respiratoires et d'oxydations cellulaires*, p. 47-114). Masson, Paris.
- KARLSON (P.), 1964. — *Biochimie*, 4^e éd. Doin, Paris.
- KAUFFMAN (C. H.), 1908. — A contribution to the physiology of the Saprolegniaceae, with special reference to the variations of the sexual organs. *Ann. Bot. London*, **22**, p. 361-387.
- KEMPF (J. E.) et SAYLER (P.), 1946. — Influence du taux d'aération sur les potentiels d'oxydo-réduction et la production de streptomycine par *Actinomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **51**, p. 596-598.
- KLEBS (G.), 1900. — Zur Physiologie der Fortpffanzung einiger Pilze. *Jahrb., wiss. Bot.*, **35**, p. 80-203. Voir dans *Bot. Gaz.*, **23**, p. 214; **28**, p. 441; **36**, p. 311.
- KOLMER (J. A.) et BOERNER (F.), 1945. — *Approved laboratory technic*. (4^e éd.). Appleton, New York.
- KUHNER (R.), 1945. — Remarques d'ordre technique sur l'étude de la répartition des noyaux dans les mycéliums de Basidiomycètes. *Bull. Soc. Linn. Lyon*, **8-9**, p. 177-181.
- LABROSSE (F.) et SAREJANNI (J.), 1929. — Changements de réaction et phénomènes d'oxydo-réduction observés au cours du développement de quelques Champignons. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **189**, p. 805.
- LABEYRIE (F.), 1963. — Réactions d'oxydo-réduction (dans LOISELEUR J. : *Techniques de laboratoire*, **1**, p. 262-295). Masson, Paris.
- LANCE (C.), 1963. — Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 12^e série, **4**, p. 1-158.
- LANGERON (M.) et VANBREUSEGHEM (R.), 1952. — *Précis de Mycologie* (2^e éd.). Masson, Paris.
- LATOUR (R.), 1957. — Contribution à l'étude de quelques quinones d'origine végétale. *Thèse Pharmacie*, Paris.
- LEFÈVRE (M.), 1952. — Auto et hétéro-antagonisme chez les Algues d'eau douce *in vitro* et dans les collections d'eaux naturelles. *Ann. Stat. cent. Hydrobiol. Appl.*, **4**, p. 5-198.

- LEHNINGER (A. L.), 1964. — *The Mitochondrion*. Benjamin, New York. — 1965, *Bioenergetics*. Benjamin, New York.
- LÉVY-HULOT (G.), 1946. — *L'analyse immédiate des bois*. Masson, Paris.
- LILLY (V. G.), 1965. — The chemical environment for Fungal growth (dans AINSWORTH (G. C.) et SUSSMAN (A. S.) : *The Fungi*, vol. **1**, p. 465-478). Academic Press, New York.
- LINDENMAYER (A.), 1965. — Terminal oxydation and electron transport. *The Fungi*, vol. **1**, p. 301-347. Ouvrage cité.
- LINGAPPA (B. T.), 1955. — Two new species of *Physoderma* from India. *Mycologia*, **47**, p. 109-121.
- LIORET (CL.), 1963. — La respiration des végétaux. Le métabolisme respiratoire des végétaux (dans THOMAS J. A. : *Problèmes de métabolismes respiratoires et d'oxydations cellulaires*, p. 205-272). Masson, Paris.
- LISON (L.), 1953. — *Histochimie et cytochimie animales*. 2^e éd. Gauthiers-Villars, Paris.
- LUND (A.), 1934. — Studies on Danish freshwater Phycomycetes and notes on their occurrence particularly relative to the hydrogen ion concentration of the water. *Mém. Acad. Roy. Sci. Danemark, Sect. Sci.* (9), **6**, p. 1-97.
- LUTZ (L.), 1930. — Sur les ferments solubles sécrétés par les Champignons hyménomycètes. Les quinones et la fonction antioxygène. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **191**, p. 881.
- LWOFF (A.), 1944. — *L'évolution physiologique, étude des pertes de fonctions chez les micro-organismes*. Hermann, Paris.
- LWOFF (A.) et SCHAEFFER (P.), 1966. — *Cours de Microbiologie*. Assoc. Corpo. Etud. Sciences, Paris.
- MACHLIS (L.), 1953. — Growth and nutrition of *Euellomyces*. I. Growth factor requirements. *Amer. J. Bot.*, **40**, p. 189-195.
- MAHLER (H. R.) et CORDES (E. H.), 1967. — *Biological chemistry*. 3^e éd. Harper, New York.
- MAYER (N.), 1929. — Sur le potentiel des solutions de glucides. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **189**, p. 319.
- MAYER (N.) et WURMSER (R.), 1926. — Sur l'oxydabilité des corps organiques à la température ordinaire. *Ann. Physiol. Physicochimie Biol.*, **2**, p. 329.
- MAYER (A.) et PLANTEFOL (L.), 1928. — Le pouvoir hydrogénant des tissus des végétaux et de leurs constituants solubles. *Ann. Physiol. Physicochimie Biol.*, **4**, p. 297.
- MICHAELIS (L.), 1929. — *Oxydations-reductions potentielle*. Julius Springer, Berlin.
- MILLER (P. M.), 1956. — Spectrographic analysis of water agar. Potatodextrose agar and V-8 juice agar. *Phytopathology*, **46**, p. 526.
- MOREAU (F. et M^{me}), 1935. — Les phénomènes cytologiques du développement de l'œuf et de la fécondation chez les Champignons du groupe des Saprologénies. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **201**, p. 1208-1210. — 1939. Recherches sur les Saprologénies. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 2^e série, **1**, p. 221-358.
- MOREAU (F.), 1952. — *Les Champignons*. Lechevalier, Paris.
- MORRIS (T. C.) et BARKSDALE (A. W.), 1967. — Isolation of a sex hormone from the water mould *Achlya bisexualis*. *Nature*, **215**, p. 320-321.
- MUSSO (H.), 1967. — Phenol coupling (dans TAYLOR W. I. et BATTERSBY A. R. : *Oxydative coupling of phenols*, p. 1-84). Dekker, Inc. New York.
- NICHOLAS (D. J. D.), 1965. — Utilisation of inorganic nitrogen compounds. *The Fungi*, vol. **1**, p. 349-376. Ouvrage cité.
- NGUYEN THI LAU (M^{lle}), 1966. — Recherches sur la croissance et la sporulation du *Saccharomyces ludwigii* Hansen. Contribution à l'étude du déterminisme de la méiose. *Bull. Soc. Myc. France*, **82**, p. 357-441.
- OKUNUKI (K.), 1966. — Cytochromes and cytochrome-oxydase. *Comprehensive biochemistry*, **14**, p. 232-308.

- OLIVE (S. L.), 1965. — Nuclear behavior during meiosis. *The Fungi*, vol. **1**, p. 143-159. Ouvrage cité.
- PAGE (R. M.), 1959. — Stimulation of asexual reproduction of *Pilobolus* by *Mucor plumbeus*. *Amer. J. Bot.*, **46**, p. 579-585.
- PAPAVIZAS (G. C.) et DAVEY (C. B.), 1960. — Some factors affecting sexual reproduction of *Aphanomyces euteiches*. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 884-889.
- PERROT (P. E.), 1960. — The ecology of some aquatic Phycomycetes. *Brit. Myc. Soc. Trans.*, **43**, p. 19-30.
- PLANTEFOL (L.), 1935. — Influence de la tension d'oxygène sur les échanges gazeux des Levures. La fermentation propre des Levures. *Ann. Physiol. Physicochim.*, **2**, p. 243-260.
- PLANTEFOL (L.), 1945. — Respiration et fermentation. Ecole Norm. Sup. Public. des Laboratoires. *Biologie*, p. 1-34. Masson, Paris.
- PRÉVOT (A. R.), 1939. — Le potentiel d'oxydo-réduction chez les Bactéries. *Bull. Soc. Philom.*, **208**, p. 394-415. — 1960. *Techniques pour le diagnostic des Bactéries anaérobies*. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé (Seine).
- PRÉVOT (A. R.) et REINERT (C.), 1942. — Emploi de la safranine, du rouge neutre et de la phénosafranine pour l'étude du pouvoir oxydo-réducteur propre des bactéries anaérobies. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **136**, p. 288-290.
- PRÉVOT (A. R.) et KAISER (P.), 1963. — Aspect du métabolisme respiratoire des Bactéries. A. Respiration aérobie (dans THOMAS J. A. : *Problèmes de métabolisme respiratoire et d'oxydations cellulaires*, p. 1-46). Masson, Paris.
- PRIDHAM (J. B.), 1960. — *Phenolics in plants in health and disease*. The formation and possible function of phenolic glycosides, p. 9-15. Pergamon Press, Oxford.
- RAHN (O.) et RICHARDSON (G. L.), 1941. — Oxygen demand and oxygen supply. *J. Bacteriol.*, **41**, p. 225-249.
- RAPER (J. R.), 1939. — Sexual hormones in *Achlya*. I. Indicative evidence for a hormonal coordinating mechanism. *Amer. J. Bot.*, **26**, p. 639-650. — 1942. Sexual hormones in *Achlya*. III. Hormone A and the initials male reaction. *Amer. J. Bot.*, **29**, p. 159-166. — 1950. Sexual hormones in *Achlya*. VII. The hormonal mechanism in homothallic species. *Bot. Gaz.*, **112**, p. 1-24.
- REED (G. B.) et ORR (J. H.), 1943. — Cultivation of anaerobes and oxidation-reduction potentials. *J. Bacteriol.*, **45**, p. 309-320.
- REISCHER (H. S.), 1951. — Growth of Saprolegniaceae in synthetic media. I. Inorganic nutrition. II. Nitrogen requirements and the role of the Krebs cycle acids. *Mycologia*, **43**, p. 142-155, 319-328.
- REISS (P.) et VELLINGER (E.), 1929. — Sur le potentiel d'arrêt de la division de l'œuf d'Oursin. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **188**, p. 100-101.
- RIBEREAU-GAYON (P.), 1968. — *Les composés phénoliques chez les végétaux*. Dunod, Paris.
- ROBBINS (W. J.), 1939. — Growth substances in agar. *Amer. J. Bot.*, **26**, p. 772-778.
- ROBERTS (R. E.), 1963. — A study of the distribution of certain members of the Saprolegniales. *Brit. Mycol. Soc. Trans.*, **46**, p. 213-224.
- SALVIN (S. B.), 1942. — Factors controlling sporangial type in *Thraustotheca primoachlya* and *Diclyuchus achlyoides*. *Amer. J. Bot.*, **29**, p. 97-104.
- SANSOME (E. R.), 1961. — Meiosis in the oogonium and antheridium of *Pythium debaryanum* Hess. *Nature*, **191**, p. 827-828. — 1963. Meiosis in *Pythium debaryanum* Hess and its significance in the life-history of the biflagellata. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **46**, p. 63-72.
- SCHADE (A. L.), 1940. — The nutrition of *Leptomitus*. *Amer. J. Bot.*, **27**, p. 376-384.
- SCHADE (A. L.) et THIMANN (K. V.), 1940. — The metabolism of the watermold *Leptomitus lacteus*. *Amer. J. Bot.*, **27**, p. 659-670.
- SIMONS (E. W.), 1950. — Effect of pH on biological activity of weak acids and bases. *Nature*, **166**, p. 343-344.
- SMALL (J.), 1946. — *pH and Plants*. Baillière, Tindall and Cox, London.
- STOREY (B. T.), 1968. — The function of ubiquinone in mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **19**, p. 307-310.

- SPARROW JR. (F. K.), 1960. — Aquatic Phycomycetes. 2^e éd. Ann. Arbor, Univ. of Michigan Press. — 1968. Ecology of Freshwater Fungi. — *The Fungi*, vol. III, p. 41-93. Ouvrage cité.
- TAYLOR (W. I.) et BATTERSBY (A. R.), 1967. — *Oxidation coupling of phenols*. Dekker, Inc., New York.
- THOMAS (P.), 1946. — *Manuel de Biochimie*. Masson, Paris.
- TREBST (A.), 1963. — The role of benzoquinones in the electron transport system. *Proced. Royal. Soc. B*, **157**, p. 355-366.
- TRUESDALE (G. A.), DOWNING (A.) et LOWDEN (G. F.), 1955. — The solubility of oxygen in pure water and seawater. *J. Appl. Chem.*, **5**, p. 53-63.
- TRUHAUT (R.) et DEYSSON (G.), 1957. — Etude comparée de l'activité antimototique de la bis-éthylèneimino-2-5-diproxy-3-6-benzoquinone sur les racines d'*Allium sativum* L. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **151**, p. 1678-1719.
- TURIAN (G.), 1954. — L'acide borique inhibiteur de la copulation gamétique chez *Allomyces*. *Experientia*, **10**, p. 498. — 1955. Culture de la phase gamétophytique d'*Allomyces javanicus* en milieu synthétique liquide. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **240**, p. 1005-1007. — 1960. Déficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. *Pathol. Microbiol.*, **23**, p. 687-699. — 1962. Effet conidiogène du malonate chez *Neurospora crassa*. *Proc. Sihe Intern. Congr. Microbiol., Montreal*, vol. A, **2** (9), p. 18. Univ. of Toronto Press, Toronto. — 1969. *Différenciation fongique*. Masson, Paris.
- TURIAN (G.) et VISWANATHAN (M. A.), 1966. — Facteurs nucléo-cytoplasmiques et différenciation sexuelle chez *Allomyces*. Inhibitions sélectives par les acridines et l'actinomycine D. *Path. Microbiol.*, **29**, p. 705-729.
- VIVIER (P.), 1952. — *La vie dans les eaux douces*. Presses Univ. de France.
- VOLKONSKY (M.), 1932. — Sur l'utilisation de différentes combinaisons du soufre par *Saprolegnia* sp. *Compt. rend. Soc. Biol.*, **109**, p. 614. — 1933. Sur l'assimilation des sulfates par les Champignons : euthiotrophie et parathiotrophie. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **197**, p. 712-714. — 1934. Sur la nutrition de quelques Champignons saprophytes et parasites. *Ann. Inst. Pasteur*, **52**, p. 76-101.
- WARD (J. M.) et NICKERSON (W. J.), 1958. — Respiratory metabolism of normal and divisionless strains of *Candida albicans*. *J. Gen. Physiol.*, **41**, p. 703-724.
- WHITNEY (R. J.), 1942. — Diurnal fluctuations of oxygen and pH in two small ponds and a stream. *J. Exp. Biol.*, **19**, p. 92-99.
- WILLIAMS (A. H.), 1960. — The distribution of phenolic compounds in apple and pear trees (dans PRIDHAM J. B.). Ouvrage cité.
- WILLIAMS (J. W.) et SULLIVAN (J. C.), 1942. — La chute du Eh dans les milieux liquides. *J. Bactériol.*, **43** (34).
- WISE (L. E.), 1946. — *Wood chemistry*. Monograph serie, n° 97, Reinh old, New York.
- WURMSER (R.), 1930. — Oxydations et réductions. Presses Universitaires de France, Paris. — 1932. La signification biologique des potentiels d'oxydo-réduction. *Biological rev.*, **7**, p. 350-381. — 1937. Les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes organiques. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4**, n° 12, p. 1942-1962. — 1965. Supplément (1930-1964) à la notice sur les titres et travaux scientifiques de M. R. WURMSER. Paillart, Abbeville.
- WURMSER (R.) et MAYER (N.), 1935. — Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la réductone. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **201**, p. 1366-1367.
- WURMSER (R.) et BANERJEE (R.), 1964. — Oxydation-reduction potentials. *Comprehensive biochemistry*, **12**, p. 62-88.
- ZIEGLER (A. W.), 1948. — A comparative study of zygote germination in the Saprolegniaceae. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **64**, p. 13-40. — 1953. Meiosis in the Saprolegniaceae. *Amer. J. Bot.*, **40**, p. 60-66.
- ZIEGLER (A. W.) et LINTHICUM (B.), 1950. — Some physiological aspects of fertility in *Achlya tuberculata*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **66**, p. 182-185.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 11 février 1970.

**Le Doyen
de la Faculté des Sciences de Paris,
MARC ZAMANSKY.**

VU
ET PERMIS D'IMPRIMER :

**Le Recteur
de l'Académie de Paris,
ROBERT MALLET.**

